

**REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*.**

**LIESEL GAMARRA REINOSO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Biólogo**

**Director**

**WILSON TERÁN**

**Doctor en Bioquímica y Biología Molecular**

**Co-director**

**NEFTALI MESA LÓPEZ**

**Magister Direccion Universitaria**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**IBAGUÉ- TOLIMA**

**2018**



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO REGENERACIÓN IN VITRO VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS IN VITRO

AUTORES Liesel Gamarra Reinoso (070100282010)

DIRECTOR Wilson Terán (Pontificia Universidad Javeriana)  
CO-DIRECTOR Neftalí Mesa López (Universidad del Tolima)

JURADOS Hilda Rocío Mosquera Mosquera (Universidad del Tolima)  
María Eloísa Aldana Jáuregui (Universidad del Tolima)

CALIFICACIÓN

4.7

☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES

FIRMAS

JURADO 1.

Director del trabajo

JURADO 2.

Director del Programa

Ciudad y fecha:

Ibagué, 13 febrero 2018



## FORMULARIO PARA EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE GRADO

### CALIFICACIÓN

#### PRIMER JURADO

NOMBRE DEL JURADO: Hilda Rocío Mosquera Mosquera

NOTA OTORGADA POR EL JURADO: 4.8

FIRMA DEL JURADO: [Firma]

#### SEGUNDO JURADO:

NOMBRE DEL JURADO: María Eloísa Aldana Jáuregui

NOTA OTORGADA POR EL JURADO: 4.6

FIRMA DEL JURADO: [Firma]

PROMEDIO FINAL DE LA NOTA DEL TRABAJO DE GRADO: 4.7

RANGOS DE EQUIVALENCIA: (Acuerdo No. 030 de 2000 del Consejo de Facultad)

Calificación menor de tres cero (3.0)  
Calificación entre tres cero (3.0) y tres nueve (3.9)  
Calificación entre cuatro cero (4.0) y cuatro cuatro (4.4)  
Calificación entre cuatro cinco (4.5) y cuatro nueve (4.9)  
Calificación de cinco cero (5.0)

REPROBADO  
APROBADO  
SOBRESALIENTE  
MERITORIO  
LAUREADO

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de grado principalmente a Dios y a mi familia y a cada una de las personas que me apoyaron a pesar de todas las circunstancias, hasta lograr culminar este proceso.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de conocer grandes personas y a su vez de estar conmigo, al profesor Wilson por tenerme paciencia y dejarme trabajar y aprender de él, al Profesor Neftalí por su apoyo para la finalización de este trabajo, a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Mary Luz, por ser un apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

## GLOSARIO

**ACIDO 2,4 DICLOROFENOXIACETICO (2,4 D):** es un herbicida sistémico hormonal auxínico muy común, usado en el control de malezas de hoja ancha. Es el tercer herbicida más ampliamente utilizado en Norteamérica, y el más usado en el mundo.

**ACIDO NAFTALACETICO (ANA):** es un compuesto orgánico de fórmula  $C_{10}H_7CH_2CO_2H$ , con propiedades hormonales. Pertenece a la familia de las auxinas y tiene usos diversos en las ciencias agrícolas, entre los cuales sobresale su utilización como agente de enraizamiento de estacas, como inductor de raíces en explantes en condiciones de asepsia (cultivo de tejidos vegetales), y como raleador químico de frutos.

**AIA (ACIDO INDOLACÉTICO):** es una auxina (regulador de crecimiento vegetal) que actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejido meristemático, el cual es indiferenciado.

**AIB (ACIDO INDOL BUTÍRICO):** se lo considera un regulador de crecimiento vegetal de la familia de las auxinas, y forma parte de muchos productos comerciales utilizados para facilitar el enraizamiento de estacas de especies hortícolas y frutales.

**AUXINAS:** reguladores de crecimiento vegetal que promueven la elongación celular.

**BENCILAMINOPURINA (BAP):** es un regulador de crecimiento de las plantas de la clase de las citoquininas. Es un citoquinina sintética de primera generación que provoca el crecimiento de la planta y el desarrollo de respuestas. Es un inhibidor de quinasa respiratoria en las plantas, y aumenta la vida post-cosecha de verduras de color verde.

**CELULASA:** es una enzima compleja especializada en descomponer celulosa, transformándola en múltiples monómeros de glucosa.

**CITOQUININAS:** reguladores de crecimiento vegetal que promueven la división y diferenciación celular.

**MACEROZIMA:** es una enzima compleja que ayuda a la descomposición de la pared celular vegetal.

**MEDIO B5 (MEDIO DE CULTIVO GAMBORG):** fue formulado por Gamborg y colaboradores en 1968 para cultivo de tejidos vegetales, específicamente en el crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de raíz de soja, empleando ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) como regulador del crecimiento.

**MEDIO MURASHIGE-SKOOG (MS):** fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo *in vitro* de tejidos.

**MEDIO WPM (WOODY PLANT MEDIUM):** es un medio utilizado para el cultivo *in vitro* de árboles.

**ORGANOGENÉISIS:** es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno.

**PROTOPLASTO:** es una célula de planta, bacteria u hongo que ha perdido total o parcialmente su pared celular, para lo cual se usan mecanismos enzimáticos que degradan los peptidoglucanos que la componen.

**REGULADOR DE CRECIMIENTO VEGETAL (RCV):** son compuestos orgánicos sintetizados en un órgano o sistema de la planta y que se translocan a otro órgano donde, a muy bajas concentraciones, provocan una respuesta fisiológica.

**TDZ (Thidiazuron):** es un compuesto derivado de la fenil-úrea desarrollado originalmente para su utilización como defoliante de algodón, pero en los últimos años ha sido muy empleado para la inducción de procesos morfogénicos.

**TIBA (ACIDO TRIYODOBENZOICO):** es un regulador de crecimiento vegetal tipo auxina.



## CONTENIDO

<b>1.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>22</b>
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>23</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>25</b>
4.1 GMELINA ARBOREA ROXB .....	25
4.1.1 Distribución geográfica y origen.. .....	25
4.1.2 Melina en Colombia.....	26
4.1.3 Taxonomía .....	27
4.1.4 Descripción morfológica. ....	28
4.1.5 Condiciones ambientales. ....	31
4.1.6 Propagación .....	31
4.1.7 Usos .....	32
4.2 REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	35
4.2.1 Organogénesis .....	36
4.2.2 Factores que influyen en la regeneración .....	38
4.3 ENRAIZAMIENTO DE BROTES .....	57
4. 4 PROTOPLASTOS .....	57
4.4.1 Tipos de pared vegetal.....	58
4.4.2 Composición de las paredes vegetales.....	59
4.4.3 Tipos de aislamiento .....	64
4.4.4. Enzimas .....	65
4.4.5 Buffer de aislamiento.....	66
4.4.6 Fuente para la obtención de protoplastos .....	67
4.4.7 Oscuridad, temperatura y tiempo de acción .....	67
4.4.8 Uso de los protoplastos.....	68

<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 GENERAL .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1.1 Específicos .....</b>	<b>69</b>
 <b>6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....</b>	 <b>70</b>
<b>6.1 MATERIAL VEGETAL.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.1 Obtención de semillas y plantas.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.2 Regeneración <i>in vitro</i> y enraizamiento .....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.3 Aislamiento de protoplastos .....</b>	<b>71</b>
<b>6.2 REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> VÍA ORGANOGÉNESIS DE <i>Gmelina arborea</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Gmelina arborea</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>6.3 ENRAIZAMIENTO DE SEGMENTOS NODALES DE MELINA.....</b>	<b>74</b>
<b>6.4 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE <i>Gmelina arborea</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>6.4.1 Tratamiento pre - aislamiento.....</b>	<b>75</b>
<b>6.4.2 Aislamiento de protoplastos .....</b>	<b>75</b>
<b>6.4.3 Conteo de protoplastos y viabilidad.....</b>	<b>76</b>
<b>6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>77</b>
 <b>7. RESULTADOS.....</b>	 <b>78</b>
<b>7.1 REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Gmelina arborea</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>7.1.1 Desdiferenciación y potencial morfogénico de diferentes fuentes de explantes.....</b>	<b>78</b>
<b>7.2 ENRAIZAMIENTO DE SEGMENTOS NODALES .....</b>	<b>84</b>
<b>7.3 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS .....</b>	<b>85</b>
<b>7.3.1 Prueba de Kruskal Wallis para los protoplastos totales y viables respecto al tiempo .....</b>	<b>86</b>
<b>7.3.2 Prueba de Kruskal Wallis para los protoplastos totales y viables frente a los tratamientos enzimáticos.....</b>	<b>87</b>
<b>7.3.3 Cantidad de protoplastos .....</b>	<b>88</b>
<b>7.3.4 Concentración enzimática vs número de protoplastos totales y viables.....</b>	<b>89</b>
<b>7.3.5 Tiempo de incubación vs número de protoplastos totales y viables.....</b>	<b>90</b>
<b>7.3.6 Prueba de viabilidad de protoplastos .....</b>	<b>94</b>

<b>8. DISCUSIONES</b> .....	96
<b>8.1 REGENERACIÓN IN VITRO DE <i>Gmelina arborea</i></b> .....	96
<b>8.1.1</b> Efecto de la combinación y de las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento en la organogénesis.....	97
<b>8.1.2</b> Potencial morfogénético de los explantes .....	101
<b>8.2 ENRAIZAMIENTO</b> .....	107
<b>8.3 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS</b> .....	110
<b>8.3.1</b> Explante .....	112
<b>8.3.2</b> Temperatura.....	113
<b>8.3.3</b> Concentración enzimática .....	113
<b>8.3.4</b> Tiempo de incubación .....	117
<b>8.3.5</b> Viabilidad.....	118
<b>8.3.6</b> Numero de protoplastos y disgregación celular .....	118
<b>8.3.7</b> Protoplastos .....	119
 <b>9. CONCLUSIONES</b> .....	 120
 <b>RECOMENDACIONES</b> .....	 121
 <b>REFERENCIAS</b> .....	 122
 <b>ANEXOS</b> .....	 148

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rango geográfico de distribución de <i>Gmelina arborea</i> (Dvorak, 2004).....	25
<b>Figura 2.</b> Distribución a nivel mundial de <i>Gmelina arborea</i> (Orwa et al., 2009).....	26
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>Gmelina arborea</i> en Colombia (Autor). ....	27
<b>Figura 4.</b> Flor de <i>Gmelina arborea</i> (Rodríguez et al., 2004a).....	28
<b>Figura 5.</b> A. frutos verdes de <i>Gmelina arborea</i> ; B. frutos maduros de <i>Gmelina arborea</i> (Rodríguez et al., 2004a).....	29
<b>Figura 6.</b> A. Endocarpos de <i>Gmelina arborea</i> (Rodríguez et al., 2004a). B. Semilla de <i>Gmelina arborea</i> (Autor).....	30
<b>Figura 7.</b> A. hojas de árboles adultos de <i>Gmelina arborea</i> ; B. hojas de plántulas de <i>Gmelina arborea</i> . (Rodríguez et al, 2004a). ....	30
<b>Figura 8. A y B.</b> Efectos de altas y bajas concentraciones de auxinas y citoquininas (Smith, 2013).....	42
<b>Figura 9.</b> Composición de la pared celular vegetal. (Cosgrove, 2005). ....	64
<b>Figura 10.</b> Respuesta de los explantes a los tratamientos.. ....	81
<b>Figura 11.</b> Medias de números de brotes respecto a cada tratamiento.....	82
<b>Figura 12.</b> (A-B). Segmentos nodales de <i>G.arborea</i> en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 $\mu$ M a los 10 días; (C-D). Segmentos nodales de <i>G.arborea</i> en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 $\mu$ M a los 18 días; E. Formación de callo en la base de un segmento nodal en un concentración de AIB 4,9 $\mu$ M; F. Formación de raíces al día 21 con una concentración de AIB 14,7 $\mu$ M. ....	85
<b>Figura 13.</b> Prueba de Kruskall Wallis para número de protoplastos totales respecto al tiempo. ....	86
<b>Figura 14.</b> Prueba de Kruskall Wallis para número de protoplastos respecto a concentración enzimática.....	87
<b>Figura 15.</b> Conteo de protoplastos durante 12 horas. ....	88
<b>Figura 16.</b> Prueba Duncan para número de protoplastos totales y viables respecto a concentraciones enzimáticas. ....	90

<b>Figura 17.</b> Prueba Duncan para número de protoplastos totales y viables respecto a tiempo de incubación. ....	90
<b>Figura 18.</b> Viabilidad de protoplastos objetivo de 40X. (A – B). Protoplastos no viables; (C –D) protoplastos viables. ....	94
<b>Figura 19.</b> Proceso de sedimentación de los protoplastos en el tratamiento 3 (celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5%) . A. 2 horas; B. 6 horas; C. 8 horas; D. 10 horas.	95

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Gmelina arborea</i> .....	27
<b>Tabla 2.</b> Principales usos de Gmelina (Moya., 2004).....	32
<b>Tabla 3.</b> Macroelementos y su función (Smith, 2013). ....	39
<b>Tabla 4.</b> Microelementos y su función (Smith, 2013). ....	39
<b>Tabla 5.</b> Auxinas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico. (Smith, 2013). .....	48
<b>Tabla 6.</b> Citoquininas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico (Smith, 2013). ....	54
<b>Tabla 7.</b> Componentes estructurales de la pared celular en las plantas. (Taiz & Zeiger, 2006). ....	63
<b>Tabla 8.</b> Enzimas que se utilizan para el aislamiento de los protoplastos (Szabados, 1991). ....	66
<b>Tabla 9.</b> Reguladores de crecimiento y concentraciones para la regeneración vía organogénesis de diferentes explantes. ....	73
<b>Tabla 10.</b> Auxinas y concentraciones para enraizamiento. ....	74
<b>Tabla 11.</b> Concentración en porcentaje de las enzimas .....	76
<b>Tabla 12.</b> Composición de buffer de extracción, solución de parada W5 y solución de re suspensión y purificación MMG. ....	76
<b>Tabla 13.</b> Resultados de regeneración con diferentes explantes de <i>Gmelina arborea</i> . ....	79
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Tukey para número de brotes en nudos cotiledonares. ....	83
<b>Tabla 15.</b> Efecto de AIB y AIA a diferentes concentraciones en el enraizamiento de segmentos nodales. ....	84
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Normalidad para los protoplastos totales y viables. ....	86
<b>Tabla 17.</b> Prueba de Duncan para protoplastos totales según el tratamiento. ....	91
<b>Tabla 18.</b> Prueba de Duncan para protoplastos viables según el tratamiento. ....	92
<b>Tabla 19.</b> Prueba de Duncan para protoplastos totales según el tiempo. ....	93
<b>Tabla 20.</b> Prueba de Duncan para protoplastos viables según el tiempo. ....	94

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Prueba de normalidad para nudo cotiledonar respecto a diferentes reguladores de crecimiento. ....	148
<b>Anexo B.</b> Homogeneidad de varianzas para nudo cotiledonar respecto a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. ....	149
<b>Anexo C.</b> Prueba de Tukey para nudo cotiledonares. ....	150
<b>Anexo D.</b> Prueba de normalidad de Shapiro Wilks para protoplastos viables y totales. ....	155
<b>Anexo E.</b> Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos totales y viables con respecto al tiempo. ....	157
<b>Anexo F.</b> Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos totales y viables con respecto a las concentraciones enzimáticas. ....	158

## RESUMEN

*Gmelina arborea* es una especie forestal de importancia comercial para países tropicales debido a características de rápido crecimiento y alta calidad de su madera en diversos usos industriales. Pero a pesar de la gran aceptación y potencial de esta especie introducida, es muy escaso el avance en términos de cultivo *in vitro*.

Gracias al uso de técnicas biotecnológicas como la regeneración *in vitro* y el aislamiento de protoplastos, el mejoramiento genético se ha visto favorecido. La regeneración, ha facilitado la producción y el establecimiento de plantaciones de forestales con características que permiten un mejor comportamiento en campo, gracias a la generación de protocolos *in vitro* los cuales son de gran importancia para la producción de un material mejorado. Además, la obtención de protoplastos permite que técnicas como la hibridación somática, y la transformación genética puedan ser aplicadas con fines de mejoramiento o facilitando el estudio funcional de genes, sin necesidad de obtener una planta completa.

Por lo tanto este trabajo buscó llenar los vacíos que se presentan para Melina en cuanto a protocolos de regeneración y aislamiento de protoplastos. Se encontró que el explante con mejor capacidad morfogenética fue el nudo cotiledonar a concentraciones de BAP 2,2  $\mu\text{M}$  y AIA 0,7  $\mu\text{M}$  y BAP 4,4  $\mu\text{M}$  con un promedio de 4,25 brotes por explante a los 14 días. Para el aislamiento de protoplastos el mejor tratamiento fue celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5% a las 10 horas con un promedio de  $9 \times 10^5$  protoplastos por ml.

**Palabras claves:** *Gmelina arborea*, regeneración *in vitro*, aislamiento de protoplastos, auxinas, citoquininas, celulasa, macerozima.



## ABSTRACT

*Gmelina arborea* is a forest specie of commercial importance for tropical countries, due to its fast growing characteristics and high quality of its wood in various industrial uses. But in spite of the great acceptance and potential of this species introduced in the country several decades ago, the advance in terms of *in vitro* culture is very little.

However, thanks to the use of biotechnological techniques such as *in vitro* regeneration and protoplast isolation, genetic improvement has been favored. Regeneration has facilitated the production and establishment of plantations of forest species with characteristics that allow better performance in the field, thanks to the generation of *in vitro* protocols which are of great importance for the production of an improved material. On the other hand, the production of protoplasts allows techniques such as somatic hybridization and genetic transformation to be applied for breeding purposes. In addition, they facilitate the functional study of genes or evaluating genes, without the need to obtain a complete plant.

Therefore, this work seeks to fill the voids that are presented for Melina in protocols of regeneration and isolation of protoplasts. Where as a final results the explant with the best morphogenetic capacity was found to be the cotyledonary node at concentrations of BAP 2.2  $\mu\text{M}$  and AIA 0.7  $\mu\text{M}$  and BAP 4.4  $\mu\text{M}$  with an average of 4.25 shoots per explant at 14 days. For the isolation of protoplasts the best treatment was cellulase R10 1.5% and macerozyme R10 0.5% at 10 hours with an average of  $9 \times 10^5$  protoplasts per ml.

**Keywords:** *Gmelina arborea*, *in vitro* regeneration, protoplast isolation, auxins, cytokinins, cellulase, macerozyme.

## INTRODUCCIÓN

La demanda de productos forestales, el deterioro progresivo de los bosques naturales, la necesidad de obtener tierras cultivables, sumado al rápido crecimiento de la población, el calentamiento global y la escasez de agua han hecho que la industria forestal busque otras alternativas para suplir su demanda (Jain, 1997).

El uso de métodos convencionales ofrecen posibilidades limitadas para la industria y programas de reforestación, siendo de gran importancia contar con tecnologías innovadoras y rentables (Cardoza, 2005). Una de estas herramientas es el uso de la biotecnología la cual a través de la manipulación, ingeniería y análisis de la variación genética, en combinación con técnicas de cultivo de tejidos y células, proporcionan las herramientas necesarias para lograr la rápida multiplicación y el mejoramiento genético de especies forestales a gran escala (Cardoza, 2005).

Actualmente, una de las formas utilizadas para poder llevar a cabo mejoramiento genético, es el uso de sistemas de transformación, para lo cual es necesario contar con protocolos de regeneración *in vitro*, en los cuales, la totipotencia de las células vegetales, junto a las distintas formulaciones de los medios de cultivo y de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), permiten obtener plantas completas a partir de cualquier explante o célula transformad. Además, del uso de los protoplastos como herramientas que favorecen el análisis genético en ensayos de mejoramiento genético.

## 1. JUSTIFICACIÓN

La producción y la efectividad de las explotaciones forestales implican la necesidad de atender la creciente demanda, como el manejo de estándares exigidos a nivel nacional e internacional, sin embargo para una efectiva actividad silvicultural con resultados eficientes, se hace necesario la obtención de material genético de excelente calidad y productividad (Suárez et al., 2006). Dentro de este componente, la tendencia de la silvicultura moderna está dirigida a la siembra y cultivo de árboles que se desarrollen en ambientes específicos con buenas características como: calidad, volumen y uniformidad en un tiempo determinado (Murillo, 2004).

Es conocido que en la mayoría de las especies forestales nativas los ciclos de aprovechamiento son con frecuencia prolongados, unido a los pocos estudios en manejo silvicultural, impiden que éstas se usen en programas de reforestación y en explotación forestal. Lo que conlleva a que los silvicultores busquen otras alternativas con especies introducidas que presentan ventajas como un ciclo de producción rápido, menor susceptibilidad a enfermedades o plagas, tolerancia a estrés además de una buena calidad de la madera (Álvarez et al., 2011).

Un ejemplo de lo mencionado, es el caso de melina, una especie originaria del sudeste asiático, que debido a sus características, puede ser utilizada para generar distintos productos que van desde la producción de pulpa hasta material para construcciones (Kannan & Jasrai, 1996), su corto ciclo de aprovechamiento, tolerancia a estrés hídrico y la alta calidad de su madera, ha despertado un gran interés a nivel comercial (Rosero et al., 2011; Town et al., 2008); además de ser fuente potencial de metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Punitha et al., 2012).

Actualmente, la biotecnología vegetal trabaja en el desarrollo de protocolos de transformación a través de la regeneración *in vitro* que han hecho posible, no solo el mejoramiento, sino que han facilitado en gran medida el conocimiento biológico asociado

a la funcionalidad de los genes identificados a través de los proyectos de genómica y genómica funcional iniciados en los últimos dos años en especies como el Eucalipto, y algunas especies de Pino y Álamo (Myburg et al., 2014; Sterky et al., 2004; Whetten et al., 2001) entre otras.

Pero, en el caso de especies forestales tropicales para algunas de las cuáles, si se han iniciado proyectos de genómica funcional (Acacia, Melina; Wong et al., 2011; Rosero et al., 2011) no se han generado protocolos de transformación genética debido a que la respuesta organogénica es muy variable entre una especie y otra, e incluso entre genotipos de una misma especie, por lo tanto se hace muy difícil el poder adaptar directamente un protocolo que haya sido optimizado para otra especie (Teixeira, 2003). Así que, para desarrollar un protocolo de transformación genética, es necesario establecer primero un sistema de regeneración *in vitro* que permita la obtención eficiente de brotes regenerados y su posterior enraizamiento.

Por otro lado la hibridación somática obtenida por medio de la fusión de protoplastos constituye una herramienta de mejoramiento complementaria para la introducción de genes de interés y la obtención de híbridos (Johnson & Veilleux, 2000; Szabados, 1987). A su vez, la transformación genética de protoplastos presenta ventajas como el poder emplear técnicas de transformación química o por medio de electroporación, las cuales permiten una mayor tasa de transformación respecto a otras fuentes de tejido celular. Igualmente, estas técnicas posibilitan la expresión transitoria de genes en protoplastos sin la necesidad de regenerar una planta completa, también facilitan las aproximaciones rápidas, versátiles y útiles con fines de validación funcional de genes (Chawla, 2002).

Por lo tanto, se hace indispensable contar con un sistema de regeneración *in vitro*, así como protocolos optimizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos, para permitir avances y nuevas oportunidades de mejoramiento y aprovechamiento del recurso generado en la especie maderable melina.

Así, el presente trabajo evaluó un protocolo de regeneración *in vitro* para melina, valorando diferentes explantes como epicótilo, hipocótilo, cotiledones, nudos cotiledonares, y hojas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, así como establecer un protocolo para el aislamiento de protoplastos, con miras a que en un futuro se pueda contar con protocolos de transformación genética tanto para los estudios funcionales de genes, como el mejoramiento genético de la especie.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el grupo de Biología de Plantas y Sistemas Productivos de la Universidad Javeriana, se desarrollaron varios proyectos de genómica funcional encaminados a identificar los genes involucrados en la respuesta de esta especie (*Gmelina arborea*) a condiciones de estrés por sequía, así como los genes expresados en madera (xilema secundario), en desarrollo, esto por medio del uso de aproximaciones transcriptómicas, que permitieron obtener el primer recurso genómico para la especie (Rosero et al., 2011), en el cual se logró identificar una gran cantidad de genes (cerca de 18000), tanto reguladores, como metabólicos involucrados en la respuesta a estrés y el desarrollo de la madera que constituyen excelentes genes candidatos a validar o estudiar con más profundidad para su empleo en mejoramiento. Además del gran interés que estos genes representan para la ingeniería genética en términos de mejoramiento, constituyen un recurso importante para estudios básicos encaminados a entender la biología de la especie, las bases de su tolerancia a sequía o del desarrollo de la madera y su regulación y afección por proceso ambientales, conocimiento indispensable previo a su aplicación en mejoramiento.

Sin embargo, un requisito indispensable para poder realizar estudios funcionales de genes, es la transformación genética y a su vez protocolos de regeneración y aislamiento de protoplastos, ya que estos permiten la realización de screening y ensayos genéticos, sobreexpresando o silenciando un determinado gen para inferir su función e importancia en determinado proceso o respuesta biológica (Smith, 2013).

Por lo tanto, en esta investigación se propuso optimizar protocolos para la regeneración *in vitro* vía organogénesis y el aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* como base para la obtención de protocolos de transformación genética, tanto como herramienta de mejoramiento como de validación funcional de genes.

### 3. ANTECEDENTES

*Gmelina arborea* es una especie nativa de regiones tropicales y subtropicales de Asia, en el mundo se encuentran aproximadamente 70000 hectáreas las cuales se encuentran distribuidas en el oeste y este de África, el sudeste de Asia, el Pacífico sur y el norte de América Latina y se espera que para el año 2020 las plantaciones se hayan extendido a 80000 hectáreas (Dvorak, 2004).

En esta especie a nivel de cultivo *in vitro*, se han realizado ensayos de micropropagación como los realizados por Álvarez & colaboradores (2011), Nakamura & Ide (1999), Valverde-Cerdas & colaboradores (2004), Naik & colaboradores (2003), Sukartiningsih & colaboradores (1999), Gamboa & Abdelnour (1999), resaltando las investigaciones realizadas en regeneración *in vitro* por Madke & colaboradores (2012) y Behera & colaboradores (2008).

Madke & colaboradores (2012) evaluaron la inducción de múltiples brotes, teniendo en cuenta factores como la fuente (hipocótilos, cotiledones, epicótilos, hojas y brote apical) y la edad de los explantes (1,2 y 3 semanas), los reguladores de crecimiento (BAP, ANA, 2,4 D y Kinetina) a diferentes concentraciones, la composición del medio (medios MS, B5, SH, WPM) y la fuente de carbono (glucosa, sacarosa y maltosa en diferentes concentraciones) los cuales intervienen en la brotación múltiple. En este estudio el explante que tuvo mayor respuesta fue el brote apical de una semana junto con el regulador de crecimiento vegetal BAP con una concentración de 2,2  $\mu\text{M}$ , generando una mayor cantidad de brotes múltiples (2,8 brotes por explante con una frecuencia de 55%) que otros reguladores y concentraciones. Para enraizamiento la auxina AIB con una concentración de 14,7  $\mu\text{M}$  (inicio enraizamiento entre los 7-10 días con una frecuencia de un 80%) fue el mejor regulador.

Behera & colaboradores (2008) usaron nudos cotiledonares como explantes para regenerar, estos fueron sembrados en medio MS suplementados con BAP y TDZ solos

o en combinación con AIA o ANA. La mejor combinación en este caso fue BAP (4,4 $\mu$ M) e AIA (1,4  $\mu$ M) los cuales dieron como resultado el inicio de la regeneración entre los 3 y 4 primeros días con un 80% de respuesta y un promedio de 15,5 brotes por explante. Los cultivos realizados en TDZ obtuvieron baja respuesta. Los brotes se enraizaron en medio MS suplementado con AIA o AIB solo o en combinación con TIBA siendo la combinación AIB (4.9  $\mu$ M) y TIBA (2  $\mu$ M) la mejor para enraizamiento con inicio de esta entre los 8 y 10 días, con una frecuencia de enraizamiento de 66,6%.



## 4. MARCO TEÓRICO

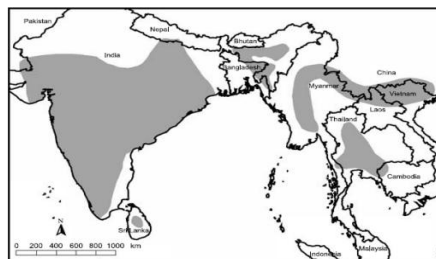
### 4.1 GMELINA ARBOREA ROXB

Las limitaciones actuales en el uso de los bosques y el deterioro del ambiente, pueden tener a futuro repercusiones en cuanto a la producción de materias primas, lo cual ha llevado a que el sector industrial genere alternativas para cumplir con sus producciones (Obregón, 2005).

La introducción de la melina (*Gmelina arborea* Roxb) a América, ha favorecido la industria maderable notablemente debido a que su madera tiene múltiples usos (Rojas et al., 2012), además de que ha representado una importante opción para proyectos de reforestación debido a su rápido crecimiento (Rojas et al., 2012; Obregón, 2005), y su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes tropicales. Melina es capaz de prosperar en tierras bajas tanto húmedas como secas (Rojas et al., 2012).

**4.1.1 Distribución geográfica y origen.** *Gmelina arborea* es una especie nativa de países del sudeste asiático, encontrándose en bosques naturales de la India, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, Sur de China, Laos, Camboya y Sumatra en Indonesia (Figura 1) (Kijkar, 2012; Orwa et al., 2009; Dvorak, 2004; Cuadrado, 1985), siendo ésta una especie de gran importancia para la producción de madera en regiones tropicales y subtropicales de Asia (Rojas et al., 2012).

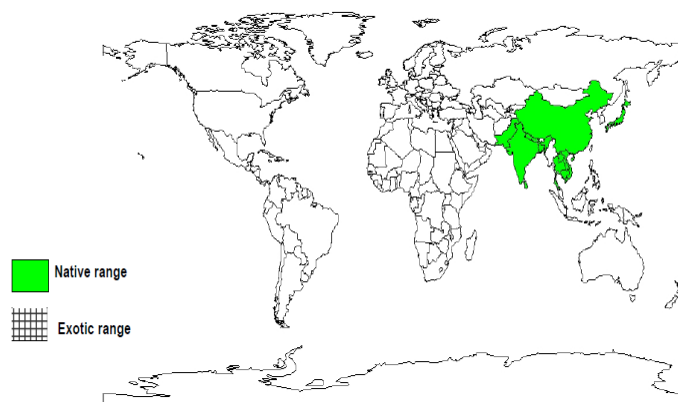
**Figura 1.** Rango geográfico de distribución de *Gmelina arborea*



Fuente:(Dvorak, 2004).

Debido a las características de interés agroforestal que presenta, esta especie ha sido introducida en muchos países tropicales incluyendo Zambia, República Central Africana, Gabón, Camerún, Congo, Senegal, Benín, Sierra Leona, Filipinas, Malasia, Gambia, Burkina Faso, Costa de Marfil, Nigeria y Malawi en África; en América ha sido introducida en Costa Rica, Brasil, Cuba, Colombia, Venezuela, Guatemala y en la zona tropical de México (Figura 2) (Kijkar, 2012; Rojas et al., 2012; Orwa et al., 2009; Obregón, 2005; Cuadrado, 1985).

**Figura 2.** Distribución a nivel mundial de *Gmelina arborea*



Fuente: (Orwa et al., 2009).

**4.1.2 Melina en Colombia:** las plantaciones comerciales de melina se encuentran principalmente en la costa norte de Colombia en los departamentos de Bolívar y Magdalena (Mariño & Rodríguez, 2010), igualmente, en los llanos orientales, en Cundinamarca, Tolima y otras zonas bajas (Obregón, 2005) (Figura 3).

En 1980 esta especie fue introducida por las empresas Pizano S.A, Monterrey y Forestal Ltda. con el fin de reforestar los suelos de la costa Caribe colombiana (Mariño & Rodríguez, 2010). Aunque en el país no es muy conocida a nivel comercial, existen alrededor de 14000 hectáreas plantadas, siendo un número importante si se compara con especies introducidas como la Teca (*Tectona grandis*), la Acacia (*Acacia mangium*), o especies nativas como Caoba, Cedro, Guayacán o Sajo (Mariño & Rodríguez, 2010).

Actualmente Pizano S.A posee alrededor de 7000 hectáreas esto es un 49,7% del total de las plantaciones, localizadas principalmente en los municipios de Zambrano (Bolívar), El Difícil de Ariguaní, Fundación y San Ángel (Atlántico) y en el municipio de Becerrín (Cesar) (Figura 3). Estas hacen parte del programa de mejoramiento llevado a cabo por Monterrey S.A., donde se trabaja en la selección y el mejoramiento convencional de árboles, dirigido al desarrollo de plantaciones clonales para sitios específicos (Obregón,2005).

**Figura 3.** Distribución de *Gmelina arborea* en Colombia



Fuente: Autor.

**4.1.3 Taxonomía:** *Gmelina arborea* pertenece a la familia *Lamiaceae* (Kok, 2012) (Tabla 1), y se encuentra relacionada con los siguientes nombres comunes: gmelina, gemelina, melina, yemane, gumhar, ganar, mai saw o yemani en Birmania. En Europa es conocida como *kashmir tree*, *malay beech* y como *White teak* o teca blanca en Inglaterra, y le peuplier d'Afrique en Francia (Obregón, 2005).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Gmelina arborea*.

Clasificación científica	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Angiospermae</i>
Clase:	<i>Eudicotyledoneae</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Lamiales</i>

Familia:	<i>Lamiaceae</i>
Género:	<i>Gmelina</i>
Especie:	<i>Gmelina arborea</i> ROXB. 1814

**4.1.4 Descripción morfológica:** es un árbol caducifolio de tamaño mediano a grande, tiene un crecimiento acelerado hasta los 5 o 6 años, edad en que su velocidad de crecimiento empieza a disminuir (Obregón, 2005). Por lo general el fuste es limpio entre los 6 a 9 primeros metros. En condiciones óptimas es capaz de alcanzar una altura de 30 metros con 60 centímetros de diámetro, sin embargo su altura promedio es de 20 metros. En lugares abiertos desarrolla ramas bajas y pesadas, con caída amplia y alta conicidad del tronco (Cuadrado, 1985) y en plantaciones su copa es densa y compacta. Su corteza es lisa o escamosa con colores desde el blanco grisáceo al marrón amarillento.

**4.1.4.1 Flores:** sus flores son numerosas, con un color amarillo anaranjado (Figura 4), en racimos, su inflorescencia es un racimo o panícula cimosa terminal, la cual mide cerca de 30 cm de largo y puede aparecer en vástagos terminales o laterales (Kijkar,2012), la bráctea mide unos 0,5 cm. Cáliz tubular, corola con 4 a 5 sépalos soldados a la base (Rodríguez et al., 2004a).

**Figura 4.** Flor de *Gmelina arborea*



Fuente: (Rodríguez et al., 2004a).

**4.1.4.2 Frutos:** es un fruto carnosos tipo drupa, de forma ovoide, de 3 cm, con pericarpio coriáceo y endocarpo óseo, de color verde lustroso cuando es inmaduro (Figura 5A) y tornándose amarillo brillante al madurar (Figura 5B), momento en que caen al suelo facilitando su recolección (Rodríguez et al., 2004 a).

**Figura 5.** A. frutos verdes de *Gmelina arborea*; B. frutos maduros de *Gmelina arborea*



Fuente: (Rodríguez et al., 2004a).

**4.1.4.3 Semilla:** es una semilla ortodoxa y debido a esto puede almacenarse a una humedad de 6 a 7%, con temperaturas  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ; estas condiciones permiten mantener la viabilidad por varios años. La semilla se encuentra formando parte del endocarpo del fruto (Figura 6A), midiendo de 1.5 a 2.0 cm de largo, de forma elipsoidal y un extremo puntiagudo, con 2 o 3 cavidades donde se encuentran de dos a tres semillas comprimidas (Kijkar, 2012). La testa de color café, lisa, opaca; la semilla es membranosa, muy delgada; el embrión es recto, comprimido, es de color amarillo-crema y ocupa toda la cavidad de la semilla; el tamaño de la semilla incrementa con el tamaño del endocarpo (Lauridsen, 1986) (Figura 6B).

**Figura 6.** A. Endocarpos de *Gmelina arborea* (Fuente: Rodríguez et al., 2004a). B. Semilla de *Gmelina arborea*



Fuente: Autor

**4.1.4.4 Hojas:** las hojas son simples, opuestas, generalmente en forma de corazón, 10 a 25 cm de largo por 5 a 18 cm de ancho (Obregón, 2005), el haz es verde y glabra, el envés es verde pálido y aterciopelado, nerviación reticulada, con nervios secundarios entre 3 a 6 pares y estípulas ausentes (Figura 7A y 7B).

**Figura 7.** A. hojas de árboles adultos de *Gmelina arborea*; B. hojas de plántulas de *Gmelina arborea*.



Fuente: Rodríguez et al, 2004a.

**4.1.4.5 Raíz:** presenta un sistema radical profundo, aunque puede ser superficial en suelos con capas endurecidas u otros limitantes de profundidad (Lauridsen, 1986).

**4.1.5 Condiciones ambientales:** Melina crece entre 0 y 900 msnm aunque se puede encontrar a los 1500 msnm. En su área de distribución natural las precipitaciones anuales pueden variar desde 760 mm hasta más de 4600 mm, con una temperatura entre 21°C y 28°C sin heladas, con 6 a 7 meses de estación seca (Kijkar, 2012; Orwa et al., 2009). Melina tiene gran plasticidad fenotípica y genotípica lo que le permite sobrevivir en un amplio rango de suelos como: ácidos, limos, calcáceos y suelos lateríticos (Castro et al., 1999).

No resiste inundaciones y su crecimiento se ve reducido en suelos delgados con capas impermeables, suelos ácidos muy lixiviados o arenas secas (Cuadrado, 1985). Sus zonas de vida según Holdridge son bosque seco-tropical, bosque húmedo tropical, bosque muy húmedo tropical, bosque húmedo pre montano y bosque muy húmedo pre montano (Yepes, 2006; Cuadrado, 1985).

**4.1.6 Propagación:** Melina es una especie de fácil establecimiento y manejo. Sus formas de propagación pueden realizarse a través de semillas, estacas o injerto (Cuadrado, 1985). Las semillas deben provenir de organismos sanos (libres de plagas y enfermedades) vigorosos y con una buena producción de frutos, para así asegurar que las plantas obtenidas de esas semillas hereden las características de los parentales (Lauridsen & Kjaer, 2002).

Para la siembra de las semillas es aconsejable que se dejen en remojo al menos por un día, antes de ser sembradas. Al sembrarse la tierra debe estar suelta y deben estar cubiertas con 0,5 a 1 cm de suelo. La germinación puede darse entre 7 y 21 días (Kijkar, 2012).

También se usa el establecimiento de tocones (Kijkar, 2012) cuando la especie es talada y su capacidad de rebrote es buena. Los vástagos que brotan están listos para la producción por esqueje enraizando a los 60 días de edad. Estas suelen establecerse adecuadamente cuando la humedad relativa es mayor o igual a 80% y una temperatura de 30°C (Kijkar, 2012).

#### 4.1.7 Usos

**4.1.7.1** Característica de la madera: ésta se caracteriza por ser liviana, de apariencia suave y sedosa. Sin sabor u olor distintivo. No existe diferencia alguna entre la albura y el duramen, su color varía de crema a pardo amarillento, tornándose pardo-rojizo con la edad (Obregón, 2005; Cuadrado, 1985).

**4.1.7.2** Usos de la madera: El principal uso de melina es la producción de madera, esta se utiliza para leña y carbón, fabricación de muebles y gabinetes, instrumentos musicales, cabos para cerillas, cubiertas de barcos y botes, también es adecuada para construcciones estructurales (artesonos, vigas, madera en cuadro y reglas), construcción en general, tarimas, artesanías, cajonería, pulpa para papel, contrachapados, embalajes, postes, tableros (Tabla 2) (Rojas et al., 2012; Obregón, 2005; Cuadrado, 1985).

Adicionalmente, la producción de pulpa de papel a partir de la madera de melina, presenta propiedades superiores a la pulpa que se obtiene de la mayoría de las maderas duras, haciendo posible este aprovechamiento (Obregón ,2005; Cuadrado 1985).

**Tabla 2.** Principales usos de Gmelina. Fuente: Moya., 2004.

Construcción	Muebles	Otros
Cerchas	Archivadores	Carretas de artesanía
Columnas sólidas	Bancas	Papel facial
Pisos y Decks	camas	Papel para imprimir
Molduras	Cómodas	Lápices
Mostradores	Juegos de comedor	Tarimas
Puertas	Juego de salas	Cajones de productos agrícolas
Rodapié	Mesas	Postes para cerca
Tablilla	Sillas	Postes para construcción
Vigas sólidas	Sillones	Fósforos
Vigas laminadas	Trinchantes	Paletas para helado
Columnas laminadas	Escritores	Palillos de dientes
Tableros laminados	Estantes para oficinas	
Marcos de puertas y ventanas		
Plywood		



**4.1.7.3 Reforestación y Sistemas Agroforestales:** en América latina, el primer país en usar melina para reforestar fue Costa Rica, ya que alrededor de los años 50, el país presentó altos índices de deforestación lo que significó que el país disminuyera el 24,4% de su cobertura forestal (Moya, 2004). Pero gracias al rápido crecimiento de melina, su uso en programas de reforestación fue de gran importancia para Costa Rica (Kok, 2012; Obregón, 2005).

En Colombia, la Corporación Autónoma Regional del río del Magdalena-CORMAGADALENA, en 1999 implementó un programa de reforestación comercial de Melina con el fin de reactivar la actividad rural y generar ingresos en la zona ribereña de Río Grande, donde un 88% de los bosques se encuentran en estado de deforestación. Los campesinos que hacen parte de este programa, son dueños de las propiedades donde conjuntamente se realizan actividades agroforestales complementarias como ganadería, que sirven de flujo de caja mientras la especie cumple su ciclo productivo (Obregón, 2005).

En sistemas agroforestales (Orwa et al., 2009), también se siembra junto a especies como el maní, tabaco, habichuela y maíz. En cultivos como los de café o cacao se usan árboles jóvenes como complemento al manejo de arvenses, además de actuar como cercas vivas, también funcionan como cortinas rompevientos y barreras protectoras (Obregón, 2005).

Estos proyectos y aprovechamientos indican las múltiples ventajas que esta especie ofrece a nivel agroforestal, industrial y a nivel de conservación del suelo (lucha contra la erosión / desertificación), todo esto debido a sus múltiples beneficios ecológicos (Orwa et al., 2009) y gracias a esto la hacen una planta promisoría para programas de reforestación (Obregón, 2005).

**4.1.7.4 Uso medicinal:** las especies cultivadas del género *Gmelina* tienen un amplio rango de usos medicinales reportados en sus países de origen (Kok, 2012). Se puede decir que todas las partes de la planta tienen un uso medicinal diferente. Los frutos, flores, hojas, raíces y corteza se usan para tratar la tos, dolores de cabeza, problemas

de estómago y enfermedades de la sangre, también se puede usar como laxativo, tónico para los nervios, como diurético, posee actividad antihelmíntica, es cardioprotector, antidiabético, antipirético analgésico (Rohit et al., 2012).

Las raíces y la corteza se usan en su mayoría para tratar dolores estomacales como laxativo, antihelmíntico y para mejorar el apetito. El uso de éstas junto con otras drogas se recomienda igualmente para el tratamiento de mordeduras de serpientes (Punitha et al., 2012). La pasta formada a partir de las hojas es usada para el alivio del dolor de cabeza, asma, bronquitis, epilepsia, reumatismo, fiebre, dispepsia, tos, diabetes y en jugo para las úlceras y cefaleas (Chothani & Patel, 2012). Las flores son dulces y son usadas para el control de la lepra y enfermedades de la sangre (Rohit et al., 2012). Los frutos promueven el crecimiento del cabello, contra la anemia, lepra y úlceras (Rohit et al., 2012). Las raíces son descritas como laxantes suaves, que tratan las flatulencias y aumentan el apetito, la lactancia y el alivio de las irregularidades menstruales (Rohit et al., 2012).

Los constituyentes químicos de melina incluyen lignanos, flavonoides, iridioides, glicósidos fenilpropanoides, un alcaloide isoxazole (Punitha et al., 2012), esteroides, triterpenoides, saponinas, proteínas, compuestos fenólicos, y carbohidratos (Chothani & Patel, 2012; Rohit et al., 2012).

**4.1.7.5 Otros:** las hojas de melina sirven como forraje para el ganado, los frutos sirven para la alimentación de venados y cerdos y sus flores producen abundante néctar del cual se produce miel de alta calidad (Kijkar, 2012; Obregón, 2005; Cuadrado, 1985). Para los frutos de melina, producidos en forma muy abundante, existen también reportes de contenidos en ácidos grasos, aceites esenciales, ceras y otros lípidos aprovechables

por la industria cosmética, también tiene gran potencial en la generación de biodiesel a partir de los desechos orgánicos de esta planta (Chothani & Patel, 2012).

Finalmente, debido a su rápido crecimiento y la sombra proporcionada por las copas de los árboles de melina, también es empleada como ornamental en calles y avenidas (Kok, 2012; Cuadrado, 1985).

## 4.2 REGENERACIÓN *IN VITRO*

La regeneración de plantas enteras a partir de células diferenciadas cultivadas *in vitro* es una clara demostración de la plasticidad de las células vegetales en respuesta a señales ambientales específicas; donde las células adquieren competencias para cambiar el destino que llevan mediante el proceso de dediferenciación seguido por la aplicación de una nueva vía de desarrollo. Esta secuencia de eventos se ve acompañada por cambios en el nivel de la cromatina y la reprogramación de la expresión génica (Marum & Marum, 2011).

Gracias a lo mencionado anteriormente la capacidad de regeneración (*ex vitro* o *in vitro*) permite, no sólo la propagación clonal o vegetativa de las plantas y su conservación, sino el desarrollo de programas de mejoramiento genético, ya que posibilita la obtención de plantas completas y genéticamente uniformes (Alves et al., 1999).

La regeneración *in vitro*, es de gran importancia para la obtención de plantas transgénicas, donde el mejoramiento biotecnológico se basa en la posibilidad de transferir una o más características de interés agronómico a las plantas por medio de la transformación genética, la cual puede hacer uso de genes propios de la especie (*cis* génesis) o de genes foráneos (*transgénesis*) (Díaz et al., 2004). Éste, amplía las oportunidades de mejoramiento de las plantas en características como resistencia a patógenos, tolerancia a estrés abiótico, rendimiento fotosintético, biofortificación, producción de fibras o metabolitos de interés industrial, etc.; además de ser una herramienta necesaria para estudios genéticos y de genómica funcional, los cuales

buscan generar conocimiento básicos de las funciones asociadas a genes y así ampliar el conocimiento de la biología y fisiología de las especies vegetales (Gutiérrez et al., 2003).

**4.2.1 Organogénesis:** en la regeneración *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una nueva planta (Smith, 2013).

La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes (epigenéticamente hablando), y por ende receptivas a procesos de dediferenciación y rediferenciación celular (Thorpe, 2014), que permitirán el desarrollo de meristemos, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur & Koncz, 2005).

En este proceso la mitosis es esencial ya que permite la formación de un número crítico de células en división activa, que son capaces de responder a señales de desarrollo; este grupo de células en división activa son llamados meristemoides, las cuales tienen forma isodiamétrica, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes, además de otros orgánulos y grandes cantidades de almidón los cuales son necesarios en números considerables durante su diferenciación (Thorpe, 2014). Los meristemoides son similares a meristemos verdaderos, ya que éstos poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y si están en condiciones adecuadas permiten el desarrollo de yemas o raíces adventicias.

La totipotencia celular hace posible que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tengan la capacidad para diferenciar y regenerar nuevos órganos (organogénesis). Aunque este es el resultado de una interacción entre el material vegetal (explanete), el medio de cultivo, las condiciones ambientales y los reguladores de crecimiento vegetal, donde desempeñan un papel fundamental (Cardoza, 2005).

Hasta el momento, la hipótesis más aceptada para explicar el control de crecimiento evidenciado en la organogénesis es que dicho proceso está regulado por cambios en los niveles endógenos y exógenos de auxinas y citoquininas. Esta hipótesis surge en 1957, cuando Skoog & Miller demuestran que la concentración relativa de auxinas y citoquininas exógenas controla la formación de órganos en cultivos de callo de médula de tabaco. De acuerdo con lo que se ha denominado el modelo de Skoog-Miller de la organogénesis, la diferenciación de yemas vegetales (caulogénesis) es promovida por balances auxina/citoquinina favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis).

Actualmente se conocen dos tipos de organogénesis: la organogénesis directa y la indirecta (Acosta, 2012).

**4.2.1.1 Organogénesis directa:** Es la producción directa de yemas o brotes de un tejido en el cual no hay estadio de callo. Las plantas *in vitro* se propagan clonalmente por organogénesis directa para mejorar los rangos de multiplicación, así como para obtener plantas transgénicas (Acosta, 2012; Cardoza, 2005).

**4.2.1.2 Organogénesis indirecta:** la organogénesis indirecta, es el desarrollo de masas de células desorganizadas y en proceso de dediferenciación y rediferenciación denominado callo (Adobkar & Ahmed, 2012). Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, interactuando con los reguladores de crecimiento vegetal endógenos para llegar a un equilibrio para la formación de órganos, una vez llegado a esto la producción de callo se detiene (Cardoza,2005). Este proceso involucra la diferenciación celular que

a su vez refleja la expresión de la totipotencia celular, interacción celular y la reacción a señales específicas (Yepes, 2006).

La generación de plantas a través de la organogénesis indirecta no asegura la fidelidad clonal, pero puede ser ideal para la selección de variantes somaclonales, debido a la variabilidad genética existente en las células somáticas o debido a la inducción de mutaciones o cambios epigenéticos, esta también puede favorecer la obtención de caracteres deseados, y el desarrollo de una multiplicación de células en masa (Cardoza, 2005).

**4.2.2** Factores que influyen en la regeneración: el éxito del cultivo de tejidos *in vitro* descansa en una buena elección del explante, la composición de los medios, reguladores de crecimiento vegetal y condiciones de cultivo tales como la temperatura, pH, luz y humedad (Smith, 2013).

Los medios usados para el cultivo *in vitro* están compuesto por 5 componentes básicos (Cardoza, 2005):

- Elementos esenciales o iones minerales, suplementados como una mezcla compleja de sales (macroelementos o macronutrientes, y microelementos o micronutrientes).
- Suplementos orgánicos, suplementados con vitaminas o aminoácidos
- Una fuente fija de carbono, usualmente un azúcar
- Agente gelificante
- Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

#### **4.2.2.1 Elementos esenciales**

- Macroelementos: como su nombre lo dice, los macroelementos son aquellos elementos que las plantas requieren en grandes cantidades para su crecimiento y desarrollo entre ellos encontramos el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), y azufre (S) y carbono (C) (este último es agregado aparte) (Tabla 3) estos elementos

usualmente comprenden al menos un 0,1% del peso seco de las plantas (Smith, 2013; Taiz & Zeiger, 2006; Pierik, 1997).

**Tabla 3.** Macroelementos y su función. (Smith, 2013).

<b>Elemento</b>	<b>Función</b>
Nitrógeno	Es un elemento requerido en grandes cantidades, componente de proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas.
Potasio	Regula el potencial osmótico y es el principal catión inorgánico.
Calcio	Sintetiza las paredes celulares, funcionamiento y señalización de la membrana celular.
Magnesio	Cofactor enzimático, componente de la clorofila.
Fósforo	Componente de los ácidos nucleicos, transferencia de energía, componente intermedio en la respiración y la fotosíntesis.
Azufre	Componente de algunos aminoácidos como la metionina y la cisteína y algunos cofactores.

- Microelementos: estos elementos se requieren en pocas cantidades para el crecimiento y desarrollo de la planta, y tienen muchos y diversos roles entre estos encontramos el manganeso (Mn), yodo (I), cobre (Cu), cobalto (Co), boro (B), molibdeno (Mb), hierro (Fe) y zinc (Zn) usualmente componen el grupo de los microelementos, además otros elementos como el níquel (Ni) y el aluminio (Al) son frecuentemente encontrados en algunas formulaciones (Tabla 4) (Smith, 2013; Taiz & Zeiger, 2006; Pierik, 1997).

**Tabla 4.** Microelementos y su función (Smith, 2013).

<b>Elemento</b>	<b>Función</b>
Hierro	Transferencia de electrones como componente de los citocromos.
Manganeso	Cofactor enzimático.
Cobalto	Componente de algunas vitaminas.
Cobre	Cofactor enzimático, reacciones de transferencia de electrones.

Elemento	Función
Zinc	Cofactor enzimáticos, biosíntesis de clorofila.
Molibdeno	Cofactor enzimático, componente de la nitrato reductasa.
Yodo	Cofactor enzimático, biosíntesis de la clorofila.
Boro	Papel estructural.

Los medios comúnmente usados están basados en el establecimiento de formulaciones definidas por Gamborg & colaboradores (1976), Linsmaier & Skoog (1965), Murashige & Skoog (1962), Schenk & Hildebrandt (1972), White (1934) y Mccown Woody Plant Medium (1981) siendo este último de gran importancia para el cultivo de forestales.

**4.2.2.2** Suplementos orgánicos: únicamente dos vitaminas, la tiamina (vitamina B1) y el mioinositol (considerada como una vitamina B) son consideradas esenciales para el cultivo *in vitro* de plantas. Sin embargo otras vitaminas como la piridoxina y el ácido nicotínico pueden mejorar el cultivo (Roca & Mroginski, 1993).

Los aminoácidos son comúnmente agregados como suplementos orgánicos. El más frecuente es el uso de la glicina (arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico, glutamina y prolina también son usados) pero en muchos casos no es esencial. Estos proveen una fuente para la reducción de nitrógeno e iones de amonio, disminuyendo la acidificación en los medios. La caseína hidrolizada puede ser usada como una fuente relativamente económica de una mezcla de aminoácidos (Cardoza, 2005).

**4.2.2.3** Fuente de carbono: muy pocas células en el cultivo *in vitro* son autótrofas, por lo tanto la provisión de una fuente exógena de carbono es de gran importancia. La fuente de carbono más común es la sacarosa, debido a que es económica, de fácil consecución, asimilable y relativamente estable. La glucosa a veces es usada en reemplazo de la sacarosa, y puede proveer iguales o mayores rangos en el crecimiento de los cultivos. Otras fuentes alternativas son la maltosa, la galactosa y el sorbitol (Litz & Jarret, 1991).



**4.2.2.4 Agentes gelificantes:** los medios de cultivo usados pueden ser líquidos, semisólidos o sólidos, esto depende del tipo de cultivo en el cual se realizará el crecimiento. En general para cualquier tipo de tejido se requiere que las células o los tejidos vegetales crezcan en la superficie del medio, este es mayormente sólido, proveyendo un mejor soporte para los explantes además de facilitar su manejo (Roca & Mroginski, 1993).

La solidificación de los cultivos se realiza mediante el uso de agar el cual es derivado de algas y es ideal para aplicaciones rutinarias. Pero debido a que es un producto natural, la calidad del agar puede variar de aplicación a aplicación y de lote a lote (Cardoza, 2005). Existen también otros tipos de agares sustitutos como el Gellrite o el Phytigel los cuales son comercialmente permitidos como variedades de Gellam gums (Litz & Jarret, 1991).

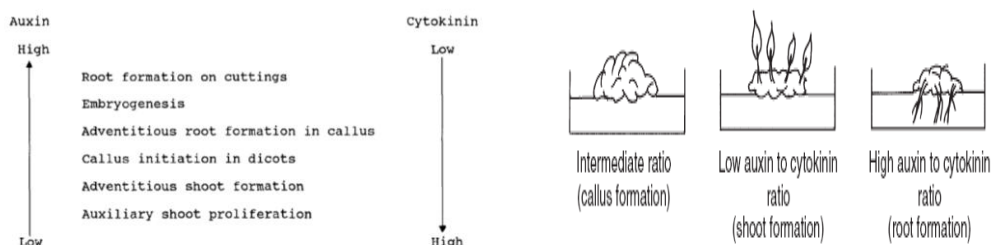
**4.2.2.5 Reguladores de crecimiento vegetal:** los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y de los tejidos en los medios. Las auxinas, las citoquininas y la giberilinas son de gran importancia en cultivo *in vitro*; sin embargo el tipo y la concentración de los RCV dependen principalmente de la especie, el tejido u órgano y el objetivo del experimento (Adobkar & Ahmed, 2012).

En procesos de regeneración las auxinas y las citoquininas son los reguladores vegetales más usados ya que altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces y altas concentraciones de citoquininas favorecen la regeneración de brotes pero cuando se aplica una adecuada concentración de auxinas y citoquininas pueden inducir la regeneración de plantas completas (Figura 8 A y B) (Smith, 2013).

Sin embargo la formulación de recomendaciones específicas para el uso de reguladores de crecimiento en cultivo de tejidos en plantas leñosas no es fácil, ya que se han realizado estudios con una amplia gama de concentraciones en numerosas combinaciones, acompañadas por pocos o sin datos cuantitativos (Minocha, 1987). Otro factor que complica el uso de los RCV, es la dificultad de igualar las concentraciones

exógenas con las endógenas a la hora de la morfogénesis, además de que esto puede afectar la división celular, las modulaciones de los genes y también es conocido que pueden afectar indirectamente en la absorción de varios iones inorgánicos y orgánicos (Saftner & Wyse, 1984).

**Figura 8. A y B.** Efectos de altas y bajas concentraciones de auxinas y citoquininas.



Fuente: Smith, 2013.

-Auxinas: el nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a sustancias que estimulan la elongación. Dentro de otras funciones también se encuentra la inhibición de yemas axiales, dando origen a la dominancia apical, promoviendo de esta forma el fototropismo positivo, desarrollando raíces laterales y adventicias y estimulando el desarrollo de los frutos.

Dentro de las auxinas más importantes encontramos el AIA, AIB, ANA y 2,4 D entre otras (Tabla 5) (Gaspar et al., 1996).

Características: dentro de la estructura interna de las auxinas se encuentra que esta cuenta con una carga negativa en el carboxilo separado por una distancia de 0,55 nm de otra carga residual positiva localizándose sobre un anillo indólico, como ejemplo tenemos el AIA o el AIB (Cossio, 2013).

Actividad: la respuesta presentada por cada órgano de la planta está determinada por su concentración, lo que supone que la planta presenta un sistema mediante el cual controla de forma eficaz la cantidad interna de reguladores (Smith, 2013). Dentro de los factores claves para la regulación de la auxina se tiene en cuenta la velocidad de biosíntesis, conjugación, hidrólisis de conjugados y oxidación, así como la intensidad del transporte de llegada (importación) y de salida (exportación) (Enders & Strader, 2015).

Dependiendo del órgano, este muestra una sensibilidad diferente a cada auxina; siendo las raíces, el órgano que presenta mayor respuesta frente a la concentración de este regulador, concluyendo que las raíces son más sensibles que las yemas, y estas más sensibles que los tallos. Pero la sensibilidad de cada tejido está sujeto a la edad y las condiciones ambientales (Cossio, 2013; Jordan & Casaretto, 2006).

La efectividad de la unión del receptor-regulador y la cadena de acontecimientos que se sucede con posterioridad a dicha unión, es dependiente de la respuesta final, donde probablemente tiene el papel más importante en la concentración de los receptores de los RCV. Algunos autores sugieren que la respuesta estaría condicionada únicamente a la sensibilidad, pero también se sugiere que la variación de la concentración del regulador y su sensibilidad son importantes para su acción (Jordan & Casaretto, 2006).  
Metabolismo: se tiene conocimiento de que el aminoácido triptófano es precursor para la síntesis de AIA, sin embargo se ha descubierto que esta también se puede llevar a cabo a partir de un precursor del triptófano. De la misma manera se ha identificado que en una misma planta, dependiendo de su edad, la síntesis de AIA puede o no ser dependiente de triptófano (Jordan & Casaretto, 2006).

Cuando la síntesis del AIA es dependiente de triptófano esta puede llevarse a cabo por diferentes rutas. En la mayoría de las especies vegetales, la ruta más frecuente es la del ácido indol pirúvico. Pero también existen otras rutas como la de la triptamina (Enders & Strader, 2015; Cossio, 2013; Jordan & Casaretto, 2006; Fernández, 2002).

Ruta del ácido indol pirúvico: la transaminación de triptófano produce ácido indol pirúvico que se descarboxila para dar indol acetaldehído; la oxidación del aldehído a ácido produce AIA. Alternativamente, algunas plantas pueden reducir el indol acetaldehído a indol-etanol, lo que puede incidir en la regulación de la biosíntesis de AIA.

Ruta de la triptamina: la descarboxilación del triptófano produce triptamina que, tras una desaminación oxidativa, se transforma en indol acetaldehído. Este compuesto es, por tanto, un intermediario común con la ruta anterior.

La presencia de una alta concentración de AIA en un tejido u órgano se podría deber a un balance favorable de transporte (AIA importado > AIA exportado) y no necesariamente a su capacidad de biosíntesis (Flors, 2000).

Además se debe tener en cuenta, la capacidad del tejido para transformar en AIA otros intermediarios de las diferentes rutas. Por lo tanto, los ápices de coleótilos, los tallos, hojas jóvenes, el cambium y las semillas en desarrollo son, en general, los lugares más importantes de biosíntesis. Sin embargo, también se ha demostrado que otros órganos como las hojas adultas, también pueden sintetizar AIA. Aunque las raíces contienen AIA, se ha cuestionado su capacidad para sintetizarlo, y se considera que la mayor parte procede del tallo (Fernández, 2002).

Transporte: una de las características de los reguladores de crecimiento vegetal es su capacidad de desplazarse desde el lugar de su biosíntesis hacia otras partes de la planta donde ejercen acción. Pero a diferencia de las hormonas animales, estas pueden ejercer una acción local en las mismas células donde se produce su biosíntesis. Esta, puede estar influenciada por factores ambientales, los cuales podrían actuar como señal moduladora del desarrollo (Jordan & Casaretto, 2006).

Estos pueden recorrer distancias cortas (entre células próximas) por difusión, y llegar a los diferentes órganos a través de los tejidos vasculares, como las células del cambium y células parcialmente diferenciadas asociadas al floema, mediante un proceso

denominado transporte polar. Las auxinas sintéticas también experimentan el transporte polar cuando son aplicadas a la planta (Mockaitis & Estelle, 2008).

Grandes cantidades de auxinas se encuentran relacionadas con procesos activos de división celular, lo cual está relacionado con sus funciones biológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (Aguilar et al., 2012).

Mecanismo de acción: la germinación de las semillas produce unas plantas que poseen órganos sencillos (coleoptilos en monocotiledóneas, hipocótilos y epicótilos en dicotiledóneas) que responden a las auxinas. El crecimiento que se observa en secciones aisladas de dichos órganos, se ve reflejado en la liberación de las restricciones que unos tejidos imponen sobre otros (la epidermis limita la expansión de otras células). Sin embargo, el incremento global e irreversible del tamaño del órgano está integrado al crecimiento de las células individuales de los distintos tejidos que lo constituyen (Davies, 1995).

La estructura de las células vegetales está condicionada por su contenido en agua y su pared rígida. Por lo que, es necesaria una fuerza directriz (gradiente de potencial hídrico favorable para la entrada de agua en la célula) para que la célula crezca, así como una alteración en las propiedades elásticas y plásticas de la pared (ablandamiento que permita la expansión celular gracias a la tensión de turgencia celular) (Davies, 1995). Este aumento de tamaño irá acompañado por la síntesis de nuevos materiales que refuerzan las membranas y rellenan las paredes y espacios apoplásticos en incremento. Este crecimiento, continuará hasta que por razones deterministas todavía no aclaradas, se produzca su cese. De esta forma se consolidara las nuevas estructuras formadas y la célula habrá alcanzado, definitivamente, un mayor tamaño (Davies, 1995).

El crecimiento implica una ruptura en algunos enlaces para permitir la expansión celular. En el caso de las monocotiledóneas parece existir una degradación en ciertos glucanos

de la pared, mientras que en las dicotiledóneas probablemente tenga lugar una despolimerización en los xiloglucanos. En ambos casos no se conocen del todo las enzimas implicadas en tales procesos. Sin embargo, uno de los mecanismos importantes podría ser la ruptura de puentes de hidrógeno entre microfibrillas de celulosa mediada por proteínas llamadas “expansinas” (Castañeda-Castro et al., 2009).

Lo mencionado anteriormente nos lleva a pensar que las auxinas deben estimular algún tipo de comunicación entre la célula y la pared que la envuelve. Desde el punto de vista bioquímico lleva a pensar en la producción, por parte de la auxina, de algún/algunos “factores de ablandamiento de la pared”. Por otra parte, desde el punto de vista biofísico, parece ser que la auxina ejerce su efecto causando un rápido incremento en la extensibilidad celular (Osborne & Mc Manus, 2005).

Rayle & Cleland (1992) propusieron de forma independiente la “teoría del crecimiento por acidificación” la cual sería causada por los protones. Pero a pesar de que hay una diferencia de pH entre los compartimientos celulares, esta teoría propone que la estimulación del crecimiento producida por la auxina se debería a la excreción de protones hacia el espacio apoplástico, con la disminución de su pH por debajo de 5,5 y la consiguiente alteración en la estabilidad de los enlaces de la pared o la actividad de ciertas enzimas.

Aunque para que la teoría tenga validez se requiere que: (a) la auxina provoque la excreción de protones en las células que crecen; (b) existe la adición de ácidos a los tejidos que ejerza un efecto similar al de la auxina (siempre que la acidez alcance las paredes celulares), (c) disoluciones reguladoras neutras infiltradas en los tejidos que contrarresten la acción de la hormona, y (d) cualquier agente que induzca la excreción de protones que provoque un crecimiento celular rápido. Diversos tejidos cumplen estos requisitos, pero existen lagunas que impiden generalizar la teoría (Davies, 1995).

El crecimiento mediante ácidos no es sostenido, sin embargo con la auxina si es posible, pero para que esto sea posible deben existir más "factores de ablandamiento" además

de los protones. El periodo de latencia en la acción también es difícil de explicar. Esto no está todavía claro, si se presenta activación de ATP-asas, alteración en su velocidad de recambio (aumento en el número de moléculas de enzima) o si la excreción de protones se realiza de forma masiva a través de la fusión de vesículas del aparato de Golgi (cargada de protones) con la membrana celular externa (Davies, 2013).

Aplicaciones comerciales: los reguladores auxínicos sintéticos fueron utilizados al principio como herbicidas debido a su estabilidad, ya que son muy resistentes a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes (Meneses, 2001).

Actualmente se comercializan en diversas formulaciones atendiendo a un amplio abanico de posibilidades de empleo, según las situaciones agrícolas, los tipos de cultivo y las formas de aplicación que existen (Jordan & Casaretto, 2006).

Clases de auxinas: dentro de los reguladores de crecimiento vegetal naturales que se aceptan, se encuentra la auxina AIA, la cual está ampliamente distribuida por todo el reino vegetal. Junto a él, también se aceptan como auxinas naturales el ácido fenilacético (detectado en tallos de tomate y girasol), algunos cloro -índoles (en guisantes) y recientemente, el ácido indolbutírico (Aguilar et al., 2012).

En cuanto a las auxinas sintéticas, las hay de naturaleza química muy diversa: ácidos índolicos, ácidos nafténicos, clorofenoxiácidos y derivados de los ácidos benzoicos y picolinico (Aguilar et al., 2012) (Tabla 5).

El AIA es la auxina natural más importante, su uso en cultivo *in vitro* es inestable al calor y la luz, por lo que algunas veces es combinado con otros aminoácidos como la alanina y la glicina para que sea más estable (Smith, 2013), esta auxina actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejido meristemático.

El AIB es una auxina muy usada para la generación de raíces en cultivo *in vitro* y *ex vitro*. Aunque no se tiene conocimiento del funcionamiento exacto, la evidencia genética sugiere que AIB se puede convertir en AIA a través de un proceso similar a la  $\beta$ -oxidación

de los ácidos grasos. Esta conversión permite pensar que la conversión de AIB es un sumidero de almacenamiento para el almacenamiento de AIA en las plantas (Zolman et al., 2008).

**Tabla 5.** Auxinas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico. (Smith, 2013).

<b>Abreviación</b>	<b>Nombre químico</b>
<b>Dicamba</b>	Ácido 3,6 diclorobenzoico 2 metoxi
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>AIB</b>	Ácido indolbutírico
<b>MCPA</b>	Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético
<b>ANA</b>	Ácido naftalen acético
<b>NOA</b>	Ácido naftoxiacético
<b>Picloram</b>	Ácido amino tricloro picolínico.
<b>2,4 D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Citoquininas: el término citoquinina surgió como nombre genérico de una serie de sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas (Smith, 2013). Actualmente se sabe que las citoquininas, como los restantes reguladores vegetales, ejercen un amplio abanico de efectos sobre el desarrollo de la plantas. Siendo las interacciones sinérgicas o antagónicas, entre auxinas y citoquininas la base para explicar una serie de procesos fisiológicos (Jordan & Casaretto, 2006).

Estructura de las citoquininas: las citoquininas naturales conocidas son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina). Todas ellas poseen un sustituyente de naturaleza isoprenoide o aromática, en el nitrógeno amínico de la posición 6 del anillo de la purina. El modo normal de escribir el nombre químico completo de una citoquinina es referirse a ella como una 6-aminopurina sustituida o como una adenina sustituida en N<sup>6</sup>. Estas pueden encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina o a la cadena lateral (Cossio, 2013). Las principales formas conjugadas de las citoquininas son: Nucleósidos, nucleótidos, glucósidos, alanil derivados, metilti derivados (Cossio, 2013).



La naturaleza química (isoprenoide o aromática) del sustituyente N<sup>6</sup> de la adenina permite clasificarlas en dos grandes clases denominadas, respectivamente, citoquininas isoprenoidicas y citoquininas aromáticas. Cada clase se subdivide en tres familias que se corresponden con las seis bases libres identificadas hasta el momento en plantas (Sakakibara, 2006; Gaspar et al., 1996):

Citoquininas isoprenoidicas: incluye las familias de la isopenteniladenina (iP), la zeatina (Z), y la dihidrozeatina [(diH) Z]. El rasgo estructural que diferencia isopenteniladenina y zeatina es la presencia, de un grupo hidroxilo unido al carbono 4 de la cadena lateral isoprenoide. Ambas poseen un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 de dicha cadena, lo que las distingue de la familia de la dihidrozeatina, cuya cadena lateral está saturada. La zeatina ha sido identificada en forma tanto *cis* como *trans*, aunque la más activa es la segunda.

Citoquininas aromáticas: incluye las familias de la benciladenina (BA), la orto-hidroxibenciladenina y la meta- hidroxibenciladenina. La cadena lateral de estas citoquininas consta de 7 carbonos estructurados en forma de grupo metil-benceno. En la orto y meta hidroxibenciladenina, el anillo de benceno presenta un radical hidroxilo en posición 2 (orto) o 3 (meta) respectivamente.

Metabolismo: las citoquininas son “únicas” entre los reguladores de crecimiento vegetal ya que varias de ellas aparecen como componentes de algunos ARNt. La actividad hormonal de las citoquininas naturales en las plantas es exclusiva de los compuestos libres y no está mediatizada por los ARNt con citoquininas. Esta afirmación se fundamenta en tres hechos experimentalmente constatados (Vlaminic, 1999): (a) La mayoría de las citoquininas naturales nunca se ha encontrado como constituyente de los ARNt; (b) La incorporación de BAP exógena a los ARNt es mínima y no es específica (no está confinada al extremo 3' del anti codón) y ( c) Los ARNt de callos de tabaco dependientes de citoquininas para su crecimiento contienen el complemento usual de citoquininas cuando son cultivados en presencia de BAP.

Las citoquininas presentes en los ARNt no se incorporan como tales al polímero sino que son producto de una modificación postranscripcional (Kieber & Schaller, 2014).

La presencia de las citoquininas en algunos ARNt abre la posibilidad de que se sinteticen a partir de la hidrólisis de dichos ARNt. Según esta hipótesis, la liberación de los derivados de isopentenil adenina y zeatina presentes en los ARNt inicia la serie de transformaciones que conduce a la formación de las distintas especies químicas de citoquininas. Aunque no se descarta que el recambio (hidrólisis) normal de los ARNt pueda contribuir a la formación de citoquininas libres, aún los datos experimentales disponibles demuestran que no es la fuente principal de citoquininas en las plantas (Vlainic, 1999; Segura, 2000b).

Aunque la hidrólisis de los ARNt puedan contribuir a la formación de citoquininas libres, las plantas poseen sistemas enzimáticos capaces de sintetizar de novo estos compuestos. Actualmente, se considera que la síntesis directa de citoquininas libres es la ruta principal (o exclusiva) existente en las plantas. Sin embargo, aún se desconocen muchas de las etapas de esta ruta directa de biosíntesis, especialmente para las citoquininas aromáticas (Vlainic, 1999). Se conoce también que las auxinas participan en el control de los niveles endógenos de citoquininas (Zhao, 2008).

Se considera, casi de forma axiomática que las citoquininas son sintetizadas, mayoritariamente, en las zonas meristemáticas de las raíces. Tal hecho, sin embargo, no excluye la participación de los órganos aéreos, especialmente los tejidos meristemáticos, en el proceso de biosíntesis de estas hormonas (Figuerola, 2015).

Durante la fase reproductiva, se reconoce que también aparecen otros centros de producción importante de citoquininas, principalmente, el endospermo (durante el desarrollo de las semillas) o el eje embrionario, los cuales se convierten en el centro de producción y de distribución de citoquininas cuando se inicia la germinación de las semillas (Jordan & Casaretto, 2006).

Una vez sintetizadas, las citoquininas pueden ser distribuidas a otras partes de la planta a través del xilema, el floema o ambos. La utilización de uno u otro sistema conductor depende del lugar donde las citoquininas fueron, inicialmente, sintetizadas. La presencia de citoquininas en los exudados ya sean de xilema o del floema, es un hecho común en la totalidad de las plantas (Velazco, 2010).

También debe considerarse que las citoquininas aplicadas exógenamente son compuestos bastante inmóviles, que ejercen efectos muy localizados (normalmente solo actúan en el órgano, o incluso solo la zona del órgano, en que fueron aplicadas) (Davies, 1995). Así mismo, los experimentos con plantas transgénicas, con el gen IPT de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control de un promotor específico de tejido, demuestran que el efecto de la producción de citoquininas se restringe a los lugares donde se expresa dicho gen. Este comportamiento ha planteado algunas dudas sobre la significación fisiológica del transporte (vía xilema o floema) de citoquininas endógenas entre los distintos órganos de la planta. Muy posiblemente, la inmovilidad de las citoquininas está ligada a las conversiones típicas de su metabolismo, que conducen a la formación de citoquininas más polares que quedan atrapadas en el interior de las células (Velazco, 2010). Las células son permeables a las bases libres y a sus respectivos ribosidos, pero impermeables a los nucleótidos polares y a los N- y O-glucósidos (Davies, 1995).

Muchas veces el control de las citoquininas está relacionado con la interacción de estas con las auxinas, la cual se manifiesta inicialmente a nivel bioquímico; ya que ambas hormonas participan en el control mutuo de su abundancia. En general, las citoquininas incrementan los niveles de auxinas mientras que las auxinas, disminuyen la concentración de citoquininas activas (Van Staden et al., 2008).

Efectos fisiológicos: este tipo de regulador es el encargado de procesos de división celular, entre estos se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares (ruptura de la dominancia apical), germinación de semillas, la maduración de cloroplastos,

resistencia a enfermedades, la diferenciación celular, además del control de varios procesos vegetales como el retardo de la de la senescencia foliar, floración y la transducción de señales (Aguilar et al., 2012).

Se piensa que estas son sintetizadas en tejidos meristemáticos como ápices radiculares, nódulos de raíces de leguminosas, yemas de tallo, semillas en germinación; estos se transportan vía xilema hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos (Aguilar et al., 2012). En la mayoría de estos procesos, las citoquininas actúan en concierto con otros estímulos, especialmente hormonales y ambientales.

De particular importancia están las interacciones de las citoquininas con las auxinas y con la luz. La interacción entre citoquininas y auxinas regula la neoformación de órganos (Van Staden et al., 2008).

Mecanismos de acción: los mecanismos moleculares de acción de las citoquininas se desconocen totalmente. No obstante y tomando como referencia otras hormonas, se asume que las citoquininas interactúan con proteínas receptoras específicas, iniciándose así una ruta de transducción de la señal que puede conducir a cambios en la expresión diferencial de genes (Zhao, 2008).

La aplicación de citoquininas exógenas a plantas completas, órganos, tejidos o células altera la expresión de un gran número de genes, conduciendo a incrementos o reducciones en la abundancia del ARNm específicos y de sus correspondientes proteínas (Kusnetsov et al., 1994).

El mecanismo mediante el cual las citoquininas regulan la expresión diferencial en los genes no es conocido, sin embargo, se tienen las siguientes generalizaciones basadas en investigaciones (Segura, 2000b):

Las citoquininas controlan la expresión génica a nivel tanto de transcripción como de pos transcripción.

Las alteraciones observadas en la expresión génica, son en la mayoría de los casos, cuantitativas y rara vez incluyen cambios cualitativos que conduzcan, por ejemplo, a una represión completa de la expresión de un determinado gen.

Los genes controlados por citoquininas también son regulados por estímulos adicionales, entre los que se encuentran otros reguladores, diversos tipos de estrés y luz. Un ejemplo clásico, es el papel de las citoquininas en la senescencia, donde los efectos de la luz, el estado nutricional y otras hormonas (p. ej., el etileno), modulan la respuesta en los tejidos. Otro ejemplo significativo es el de la nitrato reductasa, cuya expresión se modula a nivel de transcripción por la luz, citoquininas y nitrógeno. Finalmente las citoquininas interactúan con la luz en el reverdecimiento de los tejidos etiolados.

Por el momento, no ha sido posible identificar genes que respondan rápidamente (en pocos minutos) al tratamiento con citoquininas, lo que contrasta con los resultados obtenidos con otros reguladores (p. ej., auxinas). Los estudios cinéticos demuestran al respecto que la activación o la represión de genes específicos se produce, como mínimo, a las dos horas de efectuar el tratamiento con citoquininas. Por lo tanto, estos genes no representan, en principio, la respuesta molecular primaria de las citoquininas. Además en la mayoría de los casos, la respuesta es dependiente de la síntesis de novo de proteínas, lo que también sugiere que estos genes no pueden ser clasificados como genes de respuesta primaria a las citoquininas.

El análisis de los promotores de los genes controlados por citoquininas no ha permitido, por el momento, la identificación de secuencias específicas (secuencias cis) que puedan ser consideradas como “elementos que responden a las citoquininas”.

Aplicaciones comerciales: las citoquininas tienen una gran importancia económica. La industria de la micropropagación está basada en la habilidad de las citoquininas, solas o

en combinación con las auxinas, para promover el rebrote de las yemas axilares y la neo formación de tallos adventicios (Guohua, 1998).

La capacidad de las citoquininas para reducir la dominancia apical también es la base de su empleo en una serie de preparados comerciales que incrementan la ramificación de plantas con interés frutícola u ornamental (Audesirk, 1997). En este caso, se emplean, principalmente, preparados basados en BAP o en citoquininas sintéticas. En combinación con giberelinas. Estas también son utilizadas para controlar la forma y el tamaño de los frutos (Bangerth & Schroder, 1994).

El reciente descubrimiento de citoquininas aromáticas sintéticas que inhiben selectivamente el ciclo celular en plantas y animales abre grandes posibilidades para la búsqueda de nuevos agentes con actividad anticancerígena (Bifulco et al., 2008; Nordstrom et al., 2006).

Clases de citoquininas: las citoquininas están divididas en citoquininas isoprenoides y aromáticas, debido a su variación estructural (Gaspar et al., 1996). Dentro de las citoquininas isoprenoides encontramos a la zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina y dentro de la citoquininas aromáticas encontramos la benciladenina o bencilaminopurina (BAP), la kinetina y la zeatina (Tabla 6).

La BAP es una citoquinina de primera generación encargada de provocar el crecimiento de las plantas y las respuestas de desarrollo, el establecimiento de flores y estimular la generación de frutos a través de la estimulación de la división celular. También es un inhibidor de la quinasa respiratoria en las plantas, por lo tanto aumenta la vida después de la cosecha en vegetales verdes (Aguilar et al., 2012).

**Tabla 6.** Citoquininas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico (Smith, 2013).

Abreviación	Nombre químico
BAP	Benzilaminopurina o benziladenina

2iP (IPA)	Ácido indol 3 pirúvico
Kinetina	6 furfurilaminopurina
Tidiazuron	1 fenil 3 (1,2,3 tidiazol 5 il) urea
Zeatina	hidroxi 3 metil trans 2 butenilaminopurina

**4.2.2.6** Material vegetal: el explante es una parte de un tejido u órgano el cual es aislado de una planta (Litz & Jarret, 1991). La selección adecuada de este es el primer paso para el establecimiento de cultivos *in vitro*, esta elección se hace con base al objetivo a estudiar y la especie vegetal involucrada (Cardoza, 2005).

Si la elección del explante no limita el cultivo de tejidos en cuanto a la generación de callos o de brotes, la selección se hace con base a la disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad y la rápida respuesta *in vitro*. Los explantes pueden ser tomados de plantas que son germinadas en invernadero, en campo o *in vitro* en condiciones asépticas (Roca & Mroginski, 1993); si las plantas son germinadas en invernadero o en campo se debe tener en cuenta la época del año en el que se realiza el cultivo, los pre tratamientos que se le realizan a los explantes y las condiciones de crecimiento, esta última, es tanto para las plantas *in vitro* como *ex vitro*.

Se ha observado que el uso de material vegetal adulto ha dificultado el cultivo *in vitro* más que cuando se trabaja con material juvenil (material revigorizado, semillas, embriones o explantes de árboles jóvenes) ya que estos tienen mayor grado de actividad meristemática, por lo tanto tienden a tener mayor plasticidad *in vitro* (Yildiz, 2012). De acuerdo a Yepes (2006) son muy pocas las plantas que se han podido regenerar a partir de explantes de árboles maduros.

Cualquier parte de la planta desde una célula a un órgano puede ser un explante, sin embargo aquellos que provengan de órganos como la raíz o hipocótilos son materiales excelentes para la iniciación de callo y regeneración, en contraste con tallos y hojas (Mathur & Koncsz, 2005). Para que el desarrollo del explante sea de forma exitosa en los cultivos *in vitro*, estos deben tener buena adaptabilidad a las condiciones que se les

presente, ya que el aislamiento de una célula, tejido u órgano del resto de la planta, genera estrés y altera el metabolismo celular (Cardoza, 2005).

El tamaño puede determinar la respuesta *in vitro* (Yildiz, 2012). Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja además de que son dañados fácilmente (Litz & Jarret, 1991). Sin embargo, se han usado exitosamente delgadas capas de células como sistemas experimentales, con el fin de estudiar los efectos de factores exógenos y endógenos sobre la morfogénesis cuando no hay influencia de tejidos circundantes (Hussain et al., 2012).

**4.2.2.7 Factores ambientales: pH, temperatura, humedad y luz:** La luz, la temperatura, el pH y la humedad son factores que influyen el crecimiento adecuado de los cultivos *in vitro* (Cardoza, 2005).

Los cultivos de tejidos vegetales no son fotosintéticamente eficientes, incluso, por lo general no son autotróficos. No obstante, al igual que las características de la radiación influyen en el desarrollo de la planta también afectará a los procesos morfogénéticos del desarrollo. El tiempo de exposición (intensidad, el fotoperiodo y la calidad) también influye en el comportamiento y metabolismo, afectando a las actividades enzimáticas que participan en la biosíntesis de diferentes compuestos (Mathur & Koncz, 2005; Lefert et al., 1989). Por lo tanto es de gran importancia no colocar los explantes directamente a la luz ya que estos pueden causar condensación en los recipientes dando como resultado un bajo rango de crecimiento y desarrollo. Usualmente el fotoperiodo es de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

La temperatura controla la incubación, la cual suele estar entre 22 – 25°C. La humedad relativa debe estar entre un 50-60% (Litz & Jarret, 1991).

El pH del medio es importante ya que este influye el consumo de varios componentes del medio así como un amplio rango de las regulaciones de reacciones bioquímicas que



ocurren en el cultivo de tejidos (Owen et al., 1991). La mayoría de los medios son ajustados a un pH de 5,2 a 5,8.

Los pH negativos parecen no afectar los tejidos vegetales pero retrasa el crecimiento de los contaminantes potenciales. Sin embargo, pH altos son requeridos para ciertos cultivos (Cardoza, 2005).

#### **4.3 ENRAIZAMIENTO DE BROTES**

Un eficiente enraizamiento *in vitro*, es de gran importancia en el éxito de la aclimatación de las plántulas ya que de este depende en gran manera los sistemas radiculares (Ramírez et al., 1994). El enraizamiento en árboles o especies forestales es más difícil a comparación de las especies herbáceas.

Este se puede lograr de forma *ex vitro como in vitro*; en el primero, el enraizamiento reduce sus costos de producción significativamente y en el segundo el enraizamiento de plantas en condiciones axénicas es más costoso, sin embargo, este se realiza de forma *in vitro* lo que sigue siendo de uso común en muchas especies vegetales, ya que existen varias ventajas como la fácil administración de auxinas, evitar la contaminación microbiana y fúngica, la adición de nutrientes inorgánicos y carbohidratos, entre otras (Cardoza, 2005).

Uno de los factores de gran importancia en el enraizamiento *in vitro* es el manejo de las concentraciones endógenas y exógenas, en muchos casos un tratamiento con auxinas por un periodo corto de tiempo ha sido suficiente para la inducción de raíz (Minocha & Jain, 2000). Pero es conocido que algunos compuestos fenólicos contienen un efecto estimulador en el enraizamiento (Minocha & Jain, 2000).

#### **4. 4 PROTOPLASTOS**

Un protoplasto vegetal puede definirse como la parte de la célula vegetal que está delimitada e incluida dentro de la pared celular y que puede ser plasmolizada y aislada por eliminación mecánica o enzimática de la pared (Davey et al., 2005). Por lo tanto se hace referencia a este como una célula desnuda, rodeada por su membrana plasmática, potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse para así posteriormente regenerar una planta completa (Cardoza, 2005).

Estos se pueden obtener de diversas partes de la planta, cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, por ejemplo de tejidos de callo, ápices de raíz, cladodios, ápices de tallo, frutos, nódulos de raíces, coleoptilos, láminas de aleurona de cereales, microsporas e incluso de tubos polínicos; pero en la actualidad la fuente de protoplastos más habitual es el tejido de mesófilo de hojas jóvenes (Lindsey & Jones, 1992).

Al no poseer una pared celular (obstáculo físico-químico), los hace una herramienta fundamental para la investigación en biología fundamental y aplicada. La exposición completa de la membrana celular los convierte en sistemas ideales para la investigación en procesos de transporte, división celular, morfogénesis, mutagénesis, bioquímica, genética y además en el mejoramiento genético de cultivos (Rao & Prakash, 1995; Puite, 1992).

Sin embargo, el desarrollo de protocolos de aislamiento y purificación de protoplastos, son procedimientos de naturaleza compleja, debido a la mano de obra, la exposición al medio ambiente, el explante y los largos tiempos de digestión (Rao & Prakash, 1995).

Paredes vegetales y su composición: En secciones teñidas de órganos de plantas, lo más visible de las células son sus paredes celulares, que pueden variar en apariencia y composición. Por ejemplo, las paredes celulares de parénquima en la médula y la corteza son generalmente delgadas y tienen algunas características distintivas. En contraste, las células epidérmicas, de colénquima, vasos del xilema, traqueidas, fibras del floema y

otras tipos de células del esclerénquima tienen paredes más gruesas (Taiz & Zeiger, 2006).

Estas paredes son intrincadamente esculpidas e impregnadas por sustancias como la lignina, cutina, suberina, ceras, sílice o proteínas estructurales que alteran las propiedades físicas y químicas de las paredes (Obel et al., 2009).

**4.4.1** Tipos de pared vegetal: a pesar de la diversidad morfológica, las paredes celulares se clasifican comúnmente en dos: paredes primarias y secundarias. Esta clasificación no se basa en las diferencias estructurales o bioquímicas, sino más bien en el estado de desarrollo de la célula que está produciendo la pared celular. Las paredes primarias son definidas como paredes que se forman por células en crecimiento. Por lo general, son delgadas y de arquitectura sencilla, pero algunas paredes primarias pueden ser mucho más gruesas y de múltiples capas, tales como las que se encuentran en el colénquima o en la epidermis. Las paredes secundarias se forman después de que el ensanchamiento celular se detenga. Se forman entre la membrana plasmática y la pared primaria. Pudiendo llegar a especializarse especialmente en su estructura y composición, lo que refleja el estado diferenciado de la célula (Taiz & Zeiger, 2006).

Una capa delgada de material, llamada lamela media, se encuentra en la interfaz, donde las paredes de las células vecinas entran en contacto. Esta está típicamente enriquecida con pécticos, polisacáridos y puede contener proteínas estructurales diferentes de las de la pared primaria o secundaria (Taiz & Zeiger, 2006).

**4.4.2** Composición de las paredes vegetales: por masa seca, las paredes primarias se componen típicamente de aproximadamente un 25% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 40% de pectinas, y de proteína estructural tal vez entre un 2 a 5%. Sin embargo, se pueden encontrar grandes diferencias de estos valores entre especies (Harris & Stone, 2008). Las paredes secundarias se encuentran en el otro extremo, con un alto contenido de celulosa (> 90% en fibras de algodón) y cantidades insignificantes de pectina. La composición de las paredes y las estructuras de polisacáridos no son estáticas, pero

estas pueden cambiar su desarrollo como resultado de patrones alterados de síntesis y también debido a la acción de enzimas que pueden recortar las ramas laterales y digerir pectinas de pared y hemicelulosas (Gibeaut et al., 2005).

La pared primaria, puede tener una matriz de polisacáridos específicos que pueden ser muy diferentes de acuerdo a las especies, las clases de células, y las proporciones relativas de los diferentes tipos de polímeros de pared (celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina en el caso de algunas paredes secundarias), que pueden variar considerablemente. El amplio espectro de composiciones de pared celular en la naturaleza deja claro que las células vegetales tienen una amplia libertad en la construcción de sus paredes celulares para satisfacer sus necesidades (O'Neill & York, 2003).

En las paredes primarias, las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz hidratada de polisacáridos no celulósicos y una pequeña cantidad de proteínas estructurales. Esta estructura imparte una combinación ideal de flexibilidad y resistencia a la pared celular creciente, que debe ser extensible y fuerte al mismo tiempo. Las microfibrillas de celulosa son cintas cristalinas que fortalecen la pared celular más en una dirección que en otra, esto, dependiendo de cómo las microfibrillas son depositadas en la pared (Cosgrove, 2005).

En esta muchos glucanos individuales están estrechamente empaquetados para formar microfibrillas en el que están fijados y unidos entre sí por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals para formar una cinta altamente ordenada (cristalina), que excluye el agua y es relativamente inaccesible a ataque enzimático (Cosgrove, 2005).

Como resultado, la celulosa es insoluble, fuerte, estable y muy resistente a la degradación enzimática. La principal barrera al ataque enzimático de celulosa, es el coste energético de desmontar una cadena de glucanos de su microfibrilla cristalina, un paso necesario antes de que una enzima pueda atacar al enlace glicosídico que une los residuos de azúcar juntos (Skopec et al., 2003). La disposición altamente ordenada de

glucanos dentro de microfibrillas de celulosa y la gran cantidad de enlaces no covalentes da una resistencia muy alta a la tracción, equivalente a la del acero. Su estabilidad química, la insolubilidad y resistencia al ataque enzimático hacen de la celulosa un material estructural excelente para la construcción de una pared celular fuerte (Taiz & Zeiger, 2006).

Como grupo, los polisacáridos extraídos de la matriz de la pared celular con agua caliente o con quelantes de calcio se designan como pectinas, mientras que los polisacáridos no celulósicos que poseen enlaces más fuertes en la célula se definen como hemicelulosas y requieren condiciones de extracción más fuertes como el uso de 0.1-4M KOH (Taiz & Zeiger, 2006).

Las hemicelulosas son estructuralmente un grupo heterogéneo de polisacáridos lineales largos unidos firmemente a la pared, a menudo con ramas laterales cortas que característicamente se unen a la superficie de la celulosa. Pueden formar correas de sujeción que se unen a microfibrillas de celulosa, juntos en una red cohesiva o pueden actuar como un revestimiento resbaladizo para evitar que las superficies de las microfibrillas se peguen entre sí. Otro término para estas moléculas son los enlaces de glucanos (Cosgrove, 2005).

En la pared primaria de muchas plantas terrestres (eudicotiledónea y la mayoría de las monocotiledóneas, excepto gramíneas y grupos estrechamente relacionadas) la hemicelulosa más abundante es el xiloglucano, que comprende al menos un 20% de la pared celular. Al igual que la celulosa, este polisacárido tiene una cadena principal unida a residuos de  $\beta$ -D-glucosa. Pero la diferencia entre estas es que la primera tiene cadenas laterales cortas que contienen xilosa, y a menudo con una galactosa preterminal y una fucosa terminal. Esto permite pensar que las plantas pueden sintetizar diferentes tipos de hemicelulosas, variando el tipo de célula, el estado de desarrollo y la especie (Caffal & Mohnen, 2009).

Aproximadamente uno de cada cuatro residuos de glucosa en la cadena principal del xiloglucano no está sustituido, pero esta fracción se puede aumentar por la acción de  $\beta$ -xilosidasas, que eliminan la cadena lateral de xilosa (Caffal & Mohnen, 2009).

Las hemicelulosas se pueden solubilizar de paredes despectinadas usando un álcali fuerte (NaOH 2-4 M) que interrumpe el enlace de hidrógeno y causa hinchazón, hidratación y trastorno de la celulosa (Cafall & Mohnen, 2009).

Las pectinas forman una fase de gel hidratado en el que se incrusta la red de celulosa-hemicelulosa. Actúan como material de relleno hidrófilo para evitar la agregación y colapso de la red de celulosa, y también determinan la porosidad de la pared de la célula a las macromoléculas (Mohnen, 2008). Al igual que las hemicelulosas, las pectinas incluyen varios tipos de polisacáridos que a menudo son llamados "dominios de pectina", ya que se cree que están unidos covalentemente entre sí, formando estructuras macromoleculares masivas, a diferencia de los distintos polímeros de la hemicelulosa (Mohnen, 2008). Las cadenas laterales neutras que componen algunos de estos dominios pueden unirse a superficies de celulosa, aunque sean más débiles que los de hemicelulosa (Zykwinska et al., 2007).

Se caracterizan por contener una azúcar ácida galacturónica y azúcares neutros, tales como ramnosa, galactosa y arabinosa. Las pectinas son las más solubles de los polisacáridos de la pared, además se pueden extraer con agua caliente o con quelantes de calcio. En la pared, las pectinas son estructuras muy grandes y complejas compuestas por diferentes dominios de polisacáridos pécticos que se cree que están unidos entre sí por enlaces covalentes y no covalentes (Mohnen, 2008).

Algunos dominios de polisacáridos pécticos, tales como el homogalacturonano, tienen una estructura primaria relativamente simple. Otra pectina que se encuentra en grandes cantidades es el ramnogalacturonano I (RG I). El cual tiene una larga columna vertebral en alternancia con residuos de ácido galacturónico y ramnosa. Esta molécula grande y

compleja lleva a ambos lados cadenas largas y cortas de arabinanos galactanos (Mohnen, 2008).

Los polisacáridos pécticos llamados ramnogalacturonano II (RG II), contienen una columna vertebral de homogalacturonano decorado con cuatro cadenas laterales de diferentes complejos que comprenden al menos diez azúcares diferentes en un complicado patrón de vínculos (Mohnen, 2008).

Aunque RG I y RG II tienen nombres similares, tienen estructuras diferentes, las unidades de RG II están reticuladas en la pared por diésteres de borato (Mohnen, 2008; Ishii et al., 1999) que son importantes para la estructura y la resistencia mecánica de las paredes celulares.

A pesar de sus diferencias estructurales se cree que en la pared todos estos polisacáridos pécticos están unidos covalentemente entre sí, probablemente en una forma lineal (Mohnen, 2008; Coenen et al., 2007).

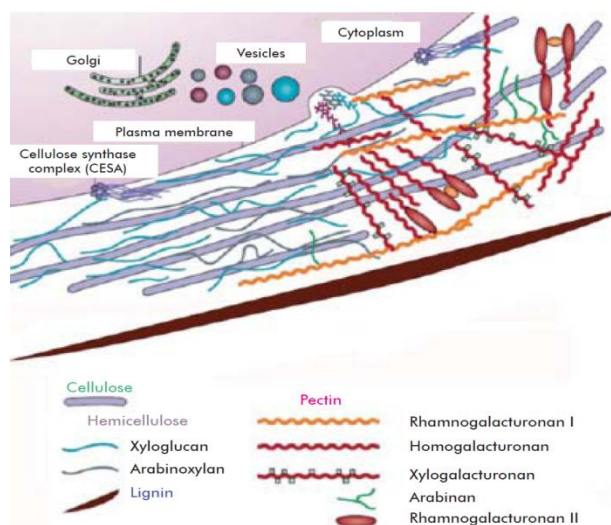
Por lo tanto las paredes celulares están compuestas por celulosas, hemicelulosas y pectinas, con menores cantidades de proteínas o lípidos, por lo tanto una adecuada mezcla de enzimas es necesaria para la degradación de la pared celular (Figura 10) (Cardoza, 2005). En la tabla 7 se resume la composición de cada uno de los elementos que componen la estructura de la pared celular vegetal.

**Tabla 7.** Componentes estructurales de la pared celular en las plantas. (Taiz & Zeiger, 2006).

Clases	Ejemplos
Celulosa	
Pectinas	Homogalacturonano Ramnogalacturonano con arabinanos, galactanos y arabinogalactanos
Hemicelulosas	Xiloglucano

Clases	Ejemplos
	Xilano Glucomanana Arabinoxilano Calosa
Lignina	Monolignoles H,G y S
Proteínas estructurales	Hidroxiprolina-rica en glicoproteínas (HRGP) (-55% de carbohidratos) se localiza en el cambium y en el parénquima vascular.  Prolina-rica en proteína (PRP) (-0-20% de carbohidratos) xilema, fibras, córtex.  Glicina-rica en proteínas (GRP) (0% de carbohidratos) xilema y floema primario.

**Figura 9.** Composición de la pared celular vegetal.



Fuente:(Cosgrove, 2005).

**4.4.3 Tipos de aislamiento:** las paredes celulares pueden ser removidas mediante tratamientos mecánicos o enzimáticos, siendo el último el más importante y efectivo (Szabados, 1991). Las primeras personas en proponer la degradación enzimática de la pared celular fueron Cocking & Pjonar (1969), desde entonces el aislamiento de



protoplastos a través de esta técnica ha sido aplicado a varios cultivos y especies forestales.

Método mecánico: este método a menudo genera resultados con bajas cantidades, baja calidad y bajo rendimiento en cultivo, debido a sustancias liberadas por las células dañadas (Szabados, 1991). Este método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se desprenden de las paredes que se rompen; posteriormente, se liberan los protoplastos de las paredes rotas mediante el restablecimiento de su nivel osmótico (Szabados, 1991).

Método enzimático: para llevar a cabo este método de aislamiento con éxito existen tres factores de gran importancia:

- El tipo de enzimas
- La composición y osmolaridad del medio donde se llevará a cabo el aislamiento y
- El material de origen de los protoplastos.

La solución enzimática requiere de todos los componentes mencionados con la finalidad de eliminar la pared celular, las lamelas medias y obtener protoplastos aislados en un medio de cultivo que le brinde la osmorregularidad y la estabilidad necesaria.

**4.4.4. Enzimas:** las enzimas usadas para el aislamiento de protoplastos son celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Szabados, 1991) (Tabla 8) las cuales son la encargadas de degradar la celulosa, hemicelulosa y pectinas encontradas en la pared celular. Estas enzimas comerciales no son puras ya que contienen otros componentes dentro de la mezcla, como por ejemplo proteasas, nucleasas y lipasas (Smith, 2013; Roca & Mroginski, 1993). Existen enzimas que no son indispensables para ciertos aislamientos pero incrementa notablemente la obtención de protoplastos con una eficiencia significativa con respecto al tiempo, entre estas tenemos las helicasas y las pectoliasas (Chawla, 2002).

El éxito del tratamiento enzimático parece estar ligado al uso combinado de estas enzimas en concentraciones y proporciones adecuadas dependiendo de la composición y estructura de la pared celular en el tejido empleado. Las enzimas permiten la liberación exitosa de los protoplastos de la mayoría de los tejidos, sin embargo se advierte que los métodos con demasiados pasos implican a menudo la introducción de contaminación en los protoplastos (Rao & Prakash, 1995).

**Tabla 8.** Enzimas que se utilizan para el aislamiento de los protoplastos (Szabados, 1991).

Enzimas	Producto comercial
<b>Celulasas</b>	
Celulasa Onozuka R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co. Ltd., Nishiromiya, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokio, Japón.
Celulisina	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Meicelasa	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio, Japón.
<b>Pectinasas</b>	
Pectinasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
Macerozima R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co., Ltd.
Macerasa	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Pectoliasa Y 23	Seishiu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japón.
<b>Hemicelulasas</b>	
Rhozima HP 150	Rohm & Haas, Filadelfia, PN, U.S.A.
Hemicelulasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

**4.4.5 Buffer de aislamiento:** está compuesto por los siguientes elementos, se trata de una solución compuesta por algunas sales como el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) esencial como protector de la integridad de la membrana, fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para conservar la viabilidad de los protoplastos, cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Szabados, 1991; Rao & Prakash, 1995; Roca & Mroginski, 1991), un amortiguador de pH como el MES (ácido 2 (N-morfolino)- etanosulfónico) y un estabilizador osmótico neutro, ya que en el momento en el que la pared celular es retirada, esta sufre un estrés hídrico, por lo tanto es importante regular y alcanzar un nivel óptimo en la presión osmótica; para este fin, se utilizan azúcares, entre los más usados encontramos la glucosa, la sacarosa, el manitol, o el sorbitol, entre otros (Pérez & Gómez, 2012; Roca & Mroginski, 1991). Generalmente

el potencial osmótico se ajusta de tal manera que las células sean levemente plasmolizadas durante la digestión de la pared celular.

**4.4.6** Fuente para la obtención de protoplastos: en teoría, es posible aislar protoplastos de cualquier órgano o tejido, pero las fuentes que se usan comúnmente son mesófilo foliar, tejidos cultivados *in vitro*, células en suspensión, callos y ápices de plántulas generadas *in vitro* (Szabados, 1991; Russel & McCown, 1986).

El estado juvenil del tejido foliar influye sustancialmente en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos, por lo tanto las plantas deben haber sido cultivadas bajo condiciones controladas, (luz, temperatura y humedad) y sin incidencias de estrés (Vasil & Thorpe, 1998).

Algunas veces los protoplastos aislados resultan más estables si las plantas se conservan previamente en la oscuridad durante algunos días, y en ciertos casos, para mejorar la viabilidad de los protoplastos aislados, es aconsejable el pretratamiento del tejido foliar en un medio con reguladores de crecimiento, en diferentes condiciones de luz y temperatura (Szabados, 1991).

Las suspensiones celulares obtenidas a partir de callo, son otra fuente para la obtención de protoplastos. Sin embargo, por lo general son heterogéneas, y a menudo están compuestas de agregados de diferentes tamaños y de células libres, por lo tanto no todas las células están en condiciones óptimas para la liberación de protoplastos; debido a esto, es importante que los mesófilos foliares crezcan en condiciones controladas (Cardoza, 2005).

**4.4.7** Oscuridad, temperatura y tiempo de acción: la oscuridad, la temperatura y el tiempo de acción son elementos claves a la hora del aislamiento, estos tres factores influyen el comportamiento de las enzimas por lo tanto la liberación eficiente y estable de los protoplastos (Rao & Prakash, 1995).

La mayoría de cultivos en los que se usan concentraciones altas de enzimas se tiende a aislar protoplastos en tiempos reducidos, la acción enzimática depende de la temperatura y la concentración de las enzimas, y el tiempo en el que pueden actuar logra ser muy variable (entre 30 minutos y 35 horas); la incubación se realiza a temperaturas entre 25 a 30°C, dependiendo de las enzimas; temperaturas menores podrían disminuir la actividad de las enzimas y mayores podrían degradar, o alterar su funcionalidad (Jadán et al., 2004; Chawla, 2002).

**4.4.8** Uso de los protoplastos: la ausencia de la pared celular en los protoplastos facilita las manipulaciones genéticas de transformación por métodos químicos o físicos como la electroporación, los cuales no sería posible emplear con plantas o células intactas con pared. Gracias a esta característica, los protoplastos son de gran utilidad en investigaciones encaminadas a validar funcionalmente secuencias génicas o regulatorias, por la facilidad en que se pueden implementar *screenings* o ensayos genéticos y visualizar los fenotipos asociados directamente en los protoplastos, como por ejemplo mediante fusiones génicas a reporteros fluorescentes (Melcher & Labib, 1974).

Otro de los usos más importantes en cuanto a mejoramiento genético asociado con los protoplastos, hace referencia a la hibridación somática o fusión de protoplastos: estas proveen la oportunidad de pasar las barreras de aislamiento reproductivo, facilitando el flujo de genes entre la misma especie e incluso entre diferentes especies (Cardoza, 2005; Szabados, 1991; Ahuja, 1983).

Aunque los protoplastos parecen ser una alternativa atractiva para la transferencia de genes y la regeneración de plantas, estos son muy vulnerables en cuanto a su manipulación. Esta es la razón por la cual la regeneración de plantas a partir de protoplastos en cultivos, ha proveído dificultades. Por lo tanto, el uso más viable o directo de los protoplastos podría enfocarse en un primer plazo, a estudios de expresión transitoria de transgenes, estudios funcionales de genes y elementos reguladores de los

mismos, o estudios de localización e interacción de proteínas, como herramientas complementarias de genómica funcional (Díaz et al., 2004).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 GENERAL**

Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis y obtención de protoplastos de *Gmelina arborea*.

#### **5.1.1 Específicos**

- Determinar las combinaciones y concentración óptimas de reguladores de crecimiento para la organogénesis *in vitro* de melina.
- Determinar el tipo de explante con mayor potencial morfogénético entre epicótilo, hipocótilo, nudo cotiledonar, cotiledones, hojas.
- Establecer un protocolo de aislamiento de protoplastos a partir de explantes foliares de plántulas de melina micropropagadas.

## **6. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **6.1 MATERIAL VEGETAL**

**6.1.1** Obtención de semillas y plantas: Los endocarpos que se usaron para el aislamiento de las semillas se obtuvieron de 2 proveedores nacionales. Para el posterior aislamiento de las semillas fue necesario un proceso de lavado, desinfección e imbibición de los endocarpos previo a la extracción manual de las mismas como se describe más adelante.

Tras una desinfección de las semillas extraídas, se procede a la germinación *in vitro* sembrandolas en medio gelificado. Una parte de las plántulas germinadas *in vitro* se micropropago y la otra fue empleada como fuente de explantes para los ensayos de regeneración.

Para el manejo del material vegetal se tomaron todas las medidas de esterilidad para material de vidrio, pinzas, bisturí, y demás utensilios necesarios en el trabajo en cámara de flujo laminar.

**6.1.2** Regeneración *in vitro* y enraizamiento: para el establecimiento de un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* se utilizaron plántulas de melina germinadas *in vitro*, tomando como explantes segmentos de hipocótilo, epicótilo, cotiledones, nudo cotiledonar y hojas respectivamente con el fin de determinar la fuente de explante con

mayor potencial morfogénico para el proceso de regeneración *in vitro*. Como complemento se buscó determinar igualmente las condiciones óptimas para el enraizamiento *in vitro* a partir de segmentos nodales de plántulas micropropagadas.

**6.1.2.1** Muestras: todos los explantes o segmentos que se utilizaron en el desarrollo del trabajo se obtuvieron de plantas germinadas *in vitro* por 13-14 días; para la selección de los explantes se tuvo en cuenta el estado físico de la plántula (sanidad y desarrollo de las plantas).

Para poder llevar un adecuado proceso de organogénesis se tuvo en cuenta la homogeneidad del tamaño del explante, que no estuviera oxidado al sembrarse y estuviera libre de contaminación. Se empleó un total de 80 segmentos de epicótilos, de hipocótilos, de cotiledones y de hojas, y 40 nudos cotiledonares. El número corresponde a los explantes utilizados en los diferentes tratamientos que se evaluaron y sus respectivas repeticiones. Se realizaron 8 réplicas por tratamiento para epicótilos, hipocótilos, cotiledones y hojas y 4 réplicas por tratamiento para nudo cotiledonar y la unidad experimental fue cada explante evaluado.

Para enraizamiento se obtuvieron segmentos nodales de plantas *in vitro*, los cuales tuviesen un buen desarrollo y no tuvieran contaminación, por tratamiento se evaluaron 9 réplicas y la unidad experimental correspondió a un frasco con un segmento nodal.

### **6.1.3** Aislamiento de protoplastos.

**6.1.3.1** Fuentes de explantes empleados en el estudio: para el aislamiento de protoplastos, se optimizó un método enzimático sobre explantes foliares obtenidos de plántulas micropropagadas, las cuales, máximo fueron propagadas dos veces a partir de semillas germinadas *in vitro*.

**6.1.3.2** Muestras: las hojas que se usaron en el aislamiento de protoplastos se obtuvieron de plántulas micropropagadas *in vitro*, también se tuvo en cuenta la calidad de las hojas,

el tamaño y que no estuviesen contaminadas.

Para la presente investigación se usaron 80 mg de hojas por réplica en tubos de 2 ml con la solución enzimática. Se usaron alrededor de 10 plantas para la obtención del material foliar, y cada tratamiento contó con 5 réplicas.

## **6.2 REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGENÉISIS DE *Gmelina arborea***

### **6.2.1 Cultivo *in vitro* de semillas de *Gmelina arborea***

**6.2.1.1 Extracción de semillas del endocarpo:** se lavaron y se cepillaron abundantemente los endocarpos con el fin de eliminar la contaminación externa, para esto se empleó hipoclorito de sodio (NaOCl) de marca comercial al 5% (v/v), jabón líquido comercial y agua. Al finalizar los lavados, 150 endocarpos se sometieron a un proceso de imbibición en 200 ml de agua en Erlenmeyer de 1 L, en agitación a 200 rpm, por 48 horas, a 30 °C con cambios de agua cada 12 horas (Gamboa & Abdelnour, 1999). Al terminar el proceso de imbibición, se realizó una primera desinfección superficial de los endocarpos sumergiéndolos en alcohol etílico al 70 % (v/v) por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 20 minutos y 5 enjuagues con agua estéril.

En cámara de flujo laminar se procedió a extraer mecánicamente las semillas (con cuchillo y pinzas), las cuales se almacenaron en cajas de Petri estériles y bajo oscuridad. Cuando finalizó el procedimiento de aislamiento de las semillas, los endocarpos se incubaron en un horno a 30°C de 10 a 12 horas antes de repetir nuevamente el proceso de imbibición/ extracción de semillas antes mencionado.

**6.2.1.2 Germinación *in vitro* de semillas:** una vez extraídas las semillas, éstas se sometieron a desinfección sumergiéndolas en alcohol etílico al 70% (v/v) por un minuto, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril, luego se agregó hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% (v/v) y 0.04 % (v/v) de Tween 20 por 10 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, antes de sumergirlas en el desinfectante PPM™ (Plant



Preservative Mixture) al 5% (v/v) por 12 horas y en agitación a 60 rpm.

Al finalizar los procesos de desinfección, se sembraron directamente las semillas en medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) suplementado con 30 gr/L de sacarosa, 2 % de PPM, 150 mg/ml del antibiótico Tricarilina, 8 gr/L de agar con un pH de 5,7. Posteriormente, se llevaron a cuarto de cultivo a 27°C con un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 1148 lumen.

**6.2.1.3 Organogénesis y regeneración in vitro:** lo planteado a continuación estuvo basado en lo realizado por Madke & colaboradores (2012); Behera & colaboradores (2008); Sukartiningsih & colaboradores (1999).

Preparación de los explantes: después de obtener plántulas de 13-14 días de germinadas, se extrajeron los explantes en cámara de flujo laminar con pinzas y bisturíes completamente estériles. Estos se cortaron en segmentos de aproximadamente 0,5 cm de largo. Teniendo en cuenta que los explantes provenientes de cultivo *in vitro* de melina tienden a deshidratarse y a oxidarse, la preparación y cortes de los explantes se realizó dentro de una caja de Petri, de manera que quedaran ligeramente embebidos en ácido ascórbico al 1% y 0,1 % de PPM<sup>TM</sup>, con el fin de mantener el vigor de los explantes y evitar posible contaminación.

Los explantes se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog), con 30 gr/L de glucosa, 8 gr/L de agar, 0,2% de PPM<sup>TM</sup> (v/v) y pH de 5,7; en presencia o no de diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento. Los diferentes tratamientos evaluados se describen en la tabla 9, como tratamiento control se empleó el mismo medio sin reguladores de crecimiento. Los explantes se llevaron al cuarto de cultivo en oscuridad por 24 horas a 27°C, y después se colocaron a luz con una intensidad de 1148 lumen y un fotoperiodo de 16 horas luz – 8 horas oscuridad.

**Tabla 9.** Reguladores de crecimiento y concentraciones para la regeneración vía organogénesis de diferentes explantes.

Tratamiento	BAP ( $\mu\text{M}$ )	AIA( $\mu\text{M}$ )
1 (control)	0	0
2	2,2	0
3	2.2	0,7
4	2,2	1,4
5	3,3	0
6	3,3	0,7
7	3,3	1,4
8	4,4	0
9	4,4	0,7
10	4,4	1,4

La eficiencia de la regeneración *in vitro* se estimó por medio de la medición de las siguientes variables: frecuencia de producción de callo, días que tardó en generar callo, frecuencia de formación de brotes, días en que tardó en salir el primer brote, número de brotes por explante al día 14.

### 6.3 ENRAIZAMIENTO DE SEGMENTOS NODALES DE MELINA

Como complemento de la regeneración *in vitro*, se buscó optimizar las condiciones de enraizamiento de brotes o segmentos de melina. Se usaron segmentos nodales de plantas micropropagadas, sembradas en medio MS, evaluando dos auxinas diferentes AIA (ácido indol acético) y AIB (ácido indol butírico,) a diferentes concentraciones (Tabla 10) y el tratamiento control fue el medio sin la presencia de ningún regulador. Las variables que se evaluaron fueron: días en que tardó en generar raíz, promedio de longitud de las raíces, promedio número de raíces y frecuencia de enraizamiento (día 21).

**Tabla 10.** Auxinas y concentraciones para enraizamiento.

Tratamiento	AIA ( $\mu\text{M}$ )	AIB ( $\mu\text{M}$ )
1	5,7	0
2	11,4	0
3	16,5	0
4	0	4,9
5	0	9,8
6	0	14,7
7(control)	0	0

#### 6.4 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea*

**6.4.1** Tratamiento pre - aislamiento: las plantas micropropagadas fuente de los segmentos foliares, se incubaron en oscuridad por 36 horas (Riofrio et al., 2012; Andreu et al., 2009;) previo a la extracción de protoplastos.

**6.4.2** Aislamiento de protoplastos: al finalizar las 36 horas, en cámara de flujo laminar, se tomaron 80 mg de tejido foliar y se cortaron tanto en el haz como en el envés (Leegood & Walker, 1979).

Previamente se preparó el buffer de extracción compuesto por 0,4 mM de manitol, 20 mM de KCl (cloruro de potasio), 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  (cloruro de calcio), 0,1% de BSA (albúmina de suero bovino) y 10 mM de MES-KOH (ácido 2 (N- morfolino 0) – etanosulfónico), ajustado a pH 5,7 (Guo et al., 2012; Osorio et al., 2010; Andreu et al., 2009; Ayala, 2007; Rodríguez & Dallos, 2004b; Ulloa & Jadan, 2003).

En este buffer de extracción se añadieron las diferentes concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10 en combinación, obteniéndose las soluciones enzimáticas respectivas (Tabla 11).

Las hojas que fueron cortadas se incubaron en tubos de 2 ml con 2 ml de solución enzimática a 27°C (Ramírez et al., 1994), a 60 rpm en oscuridad (Ayala, 2007).

Se tomaron alícuotas de 100 µl cada dos horas por 12 horas los cuales se filtraron en una malla de 70 micras, después de filtrarse se colocaron en un tubo de 2 ml y se agregaron 500 µl de la solución W5 (Tabla 12) empleada para detener la acción de las enzimas y se agregó 400 µl de buffer de extracción (sin enzimas) (Tabla 12). Posteriormente se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos, eliminándose el sobrenadante y los protoplastos presentes en el pellet fueron resuspendidos en 100 µl de solución MMG (Tabla 12) (Lin et al., 2014; Guo et al., 2012).

**6.4.3** **Conteo de protoplastos y viabilidad:** para determinar el número de los protoplastos aislados, se tomó una muestra de 10 µl de la suspensión de protoplastos y se realizó un conteo en un microscopio óptico utilizando una Cámara de Neubauer (Melchiorre et al., 2009) y la metodología de recuento estándar, con objetivo de 10X y un ocular de 4X.

Para evaluar la viabilidad se tiñeron los protoplastos con colorante azul Evans al 1% (Botero et al., 2011) que tiñe los protoplastos que no son viables de color azul al observarse al microscopio.

**Tabla 11.** Concentración en porcentaje de las enzimas

<b>Tratamiento</b>	<b>Celulasa R10 (%)</b>	<b>Macerozima R10 (%)</b>
1 (control)	0	0
2	0,5	0,3
3	1	0,4
4	1,5	0.5

**Tabla 12.** Composición de buffer de extracción, solución de parada W5 y solución de re suspensión y purificación MMG.

Composición de la solución enzimática	composición de la solución de parada W5	Composición de la solución de purificación MMG
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Manitol 0,4 M</li> <li>•KCl 20 mM</li> <li>•CaCl<sub>2</sub> 10 mM</li> <li>•ASB 0,1%</li> <li>•MES-KOH pH:5,7; 10 mM</li> <li>•Diferentes concentraciones de celulasa y macerozima.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MES-KOH pH 5,7; 2mM</li> <li>•NaCl 154 mM</li> <li>•CaCl<sub>2</sub> 125 mM</li> <li>•KCl 5 mM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MES-KOH pH: 5,7; 4 mM</li> <li>•Manitol 0,4 M</li> <li>•MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio) 15 mM</li> </ul>

## 6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los ensayos experimentales se realizaron siguiendo un diseño factorial completamente al azar, con 8 réplicas independientes en el ensayo de regeneración para los explantes hojas, cotiledones, epicótilos e hipocótilos y 4 réplicas para nudo cotiledonar, siendo la unidad experimental cada explante: 8 o 4 x 10 x 5 siendo 8 o 4 el número de réplicas, 10 el número de tratamientos y 5 el número de explantes a evaluar.

Para el ensayo de enraizamiento fueron 9 réplicas y la unidad experimental fue cada segmento nodal, se usó un diseño factorial 9x7x1 siendo 9 el número de réplicas, 7 el número de tratamientos y 1 el tipo de explante.

Para el aislamiento de protoplastos fueron 5 réplicas por cada tratamiento siendo la unidad experimental los 80 mg de hoja en buffer de extracción: 5x4x6 donde 5 es el número de réplicas, 4 son los tratamientos, 6 los tiempos en horas del tratamiento enzimático.

Las diferencias estadísticas entre tratamientos se detectaron mediante análisis de varianza (ANOVA y Kruskal Wallis) y pruebas específicas (Tukey y Duncan), previa verificación de la homogeneidad de varianzas (normalidad) utilizando el programa SPSS.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 REGENERACIÓN IN VITRO DE *Gmelina arborea*

El éxito en los sistemas de regeneración *in vitro* de plantas recae en la buena elección del explante junto a una adecuada combinación de reguladores de crecimiento vegetal. Por lo tanto la finalidad de este trabajo fue encontrar la mejor combinación de RCV junto a un explante que presentare la mejor respuesta, esto con el fin de obtener brotes múltiples y de esta manera maximizar la eficiencia de regeneración *in vitro*.

Como complemento a la regeneración se buscó establecer cuál es la mejor auxina y concentración de la misma para un enraizamiento eficiente.

**7.1.1** Desdiferenciación y potencial morfogénético de diferentes fuentes de explantes: para la inducción de brotes múltiples se evaluaron 5 tipos de explantes: hojas, cotiledones, epicótilos, hipocótilos, y nudos cotiledonares, estos se sometieron a diferentes tratamientos compuestos por la combinación de diferentes concentraciones de la citoquinina BAP y de la auxina AIA. Como control, estos explantes se sembraron en el mismo medio de cultivo desprovisto de RCV. Se aclara que la frecuencia de callogénesis y de regeneración se obtuvo con base al promedio de las réplicas hechas para cada explante.

La respuesta para explantes provenientes de hojas, epicótilos, hipocótilos y cotiledones no produjo brotes en ninguno de los tratamientos evaluados. Sin embargo, se observó producción de callos en todos los tratamientos a excepción del control. Los únicos explantes que desarrollaron callo y brotes a la vez fueron los nudos cotiledonares (Tabla 13). Adicionalmente, los nudos cotiledonares fueron los primeros en los que se observó tanto callogénesis (día 8) como brotación (día 5).

**Tabla 13.** Resultados de regeneración con diferentes explantes de *Gmelina arborea*.

TRATAMIENTO		HOJA		EPICÓTILO		HIPOCÓTILO		COTILEDÓN		NUDO COTILEDONAR		
BAP ( $\mu$ M)	AIA ( $\mu$ M)	Frec %	DR	Frec %	DR	Frec %	DR	Frec %	DR	B/E	Frec %	DR
0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	3 - 5
2,2	0	100	13 - 14	0	0	87,5	5 - 14	100	13 - 14	1,25	50	3 - 5
2,2	0,7	50	13 - 14	100	5 - 14	100	5 - 6	50	13 - 14	4,25	100	3 - 5
2,2	1,4	100	11 - 14	100	6 - 7	100	5 - 11	100	11 - 14	2,5	100	3 - 5
3,3	0	12,5	13 - 14	75	11 - 14	75	6 - 14	12,5	13 - 14	2,5	100	3 - 5
3,3	0,7	75	11 - 14	75	6 - 14	100	11 - 14	75	11 - 14	3,25	50	3 - 5
3,3	1,4	100	11 - 12	62,5	5 - 14	75	5 - 6	100	11 - 12	3,75	100	3 - 5
4,4	0	0	0	50	6 - 11	88	6 - 11	0	0	4,25	100	3 - 5
4,4	0,7	62,5	13 - 14	62,5	6 - 14	100	5 - 6	62,5	13 - 14	1,75	100	3 - 5
4,4	1,4	0	0	75	5 - 14	75	5 - 11	0	0	3	100	3 - 5

Frec % (Porcentaje de frecuencia); DR (Días en regenerar); BE (Brotes por explante en promedio)

Dentro de los mejores tratamientos para la frecuencia de regeneración están la BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y BAP 3,3  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y los que tuvieron menor respuesta fueron BAP 4,4  $\mu$ M, BAP 4,4  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y BAP 3,3  $\mu$ M.

Respecto al tiempo de regeneración los tratamientos BAP 4,4  $\mu$ M y BAP 4,4  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M mostraron una respuesta más lenta; mientras que BAP 3,3  $\mu$ M solo y en combinación con AIA 0,7  $\mu$ M respondieron más rápido.

En cuanto a los explantes y la relación con los reguladores de crecimiento vegetal evaluando la frecuencia de regeneración y el tiempo, se observó que el explante con mejor potencial morfogénico es el nudo cotiledonar seguido en la frecuencia de

regeneración con el hipocótilo y el epicótilo; las hojas y los cotiledones siendo estos dos últimos grupos similares en sus resultados.

En cuanto al tiempo se encontró que el mejor explante fue el epicótilo seguido del hipocótilo, cotiledones y hojas presentando resultados iguales; sin embargo la el hipocótilo y epicótilo no varía mucho.

Interesantemente, la callogénesis evidenciada en epicótilos presentó una organización muy diferente al resto de explantes. Las características del callo generado a partir de los epicótilos se asemejan a las de callo embriogénico (Figura 10G). Sin embargo, al tiempo de evaluación de este ensayo no fue posible evidenciar formación de embriones somáticos.

Los tratamiento con mayor generación de brotes fueron BAP 2,2  $\mu$ M– IAA 0,7  $\mu$ M (Figura 10 N) y BAP 4,4  $\mu$ M (Figura 10 M y O) con 4,25 brotes por explante, la frecuencia de regeneración fue de un 100% en casi todos los tratamientos a excepción de los tratamientos BAP 2,2  $\mu$ M y BAP 3,3  $\mu$ M – IAA 0,7  $\mu$ M con un 50% de regeneración, y del tratamiento control (0% de regeneración). Esto evidencia el alto potencial morfogénico de este explante y su idoneidad en regeneración *in vitro* para *Gmelina arborea*.

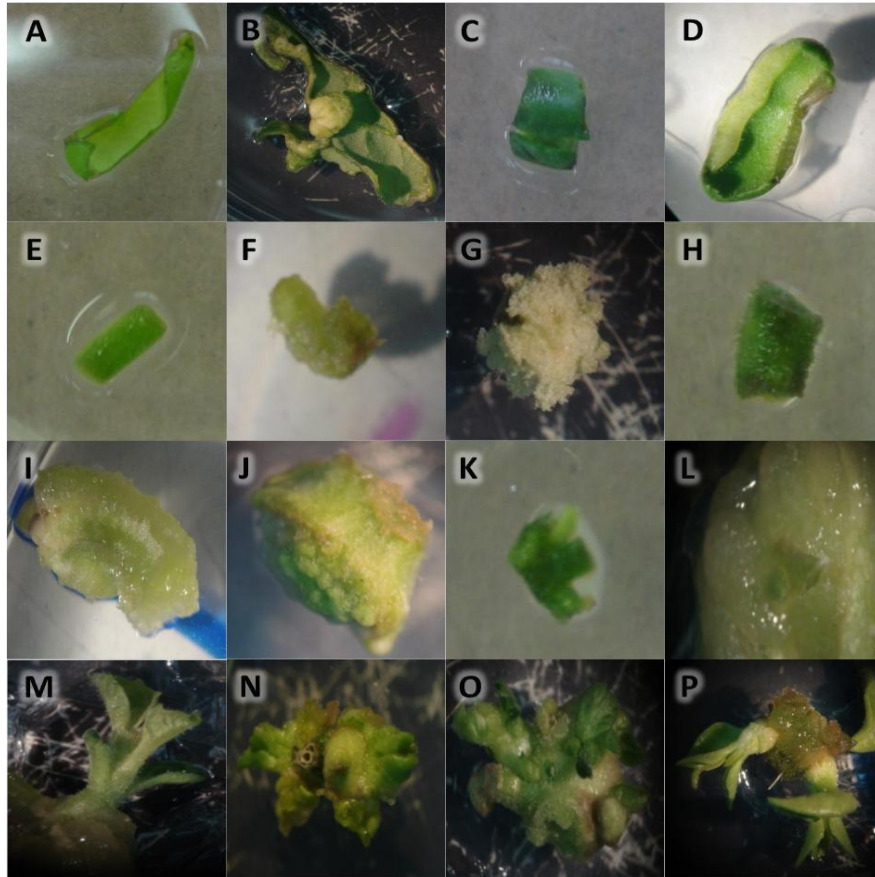
El crecimiento y desarrollo de los brotes se presentó en tiempos muy cortos entre los primeros 5 días. Esto estuvo asociado al desarrollo de un poco de callo. Aunque algunos de los explantes desarrollaron organogénesis directa.

Los resultados de regeneración *in vitro* obtenidos a partir de nudos cotiledonares son muy alentadores debido a la rapidez de la respuesta morfogénica como al alto número de brotes múltiples obtenidos a los 14 días (4.25 brotes por explante en promedio). Este resultado es de gran importancia de cara al desarrollo de protocolos de transformación genética en melina y dejan presagiar que podrá ser posible obtener plantas transformadas de melina en tiempos relativamente cortos, algo deseable y poco frecuente en una especie forestal.



Aunque el número de brotes respecto a los tratamientos fue normal (Anexo 1) no hubo homogeneidad de varianzas, lo cual nos indica que no hubo diferencias significativas (Anexo 2). Sin embargo, tras realizar la prueba de Tukey HSD (Tabla 14 y Figura 11) para observar diferencias entre tratamientos no se encontraron diferencias entre los tratamientos incluyendo el control esto se puede deber a que el número de réplicas hechas (4) no fue suficiente para poder establecer diferencia entre los mismos. (Anexo 3).

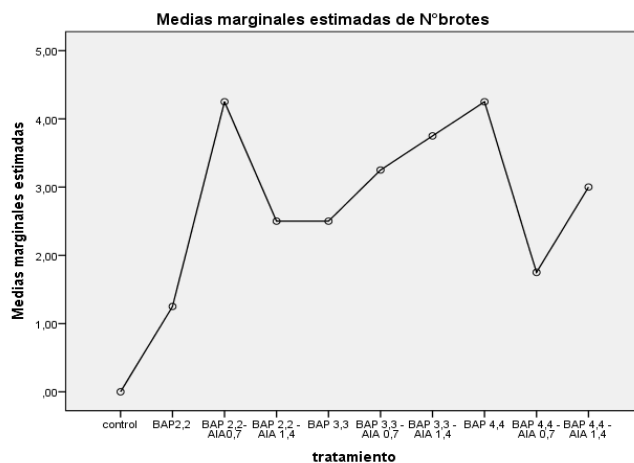
**Figura 10.** Respuesta de los explantes a los tratamientos. (A-B) Explante de hoja a los 5 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y a los 14 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M. (C-D) Explante de cotiledón a los 5 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y a los 14 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M. (E-G) Explante de epicótilo a los 5 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M, a los 14 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y a los 14 días en tratamiento BAP 3,3  $\mu$ M – AIA 0,7  $\mu$ M. (H-J) Explante de hipocótilo a los 5 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M, a los 14 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M y a los 14 días en tratamiento BAP 3,3  $\mu$ M – AIA 0,7  $\mu$ M. (K) Explante de nudo cotiledonar a los 5 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 0,7  $\mu$ M. (L) Inicio de Organogénesis en nudo cotiledonar a los 4 días en tratamiento BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 1,4  $\mu$ M. (M-P) Elongación de brotes de nudo cotiledonar a los 14 días en tratamiento BAP 4,4  $\mu$ M, BAP 3,3  $\mu$ M – AIA 0,7  $\mu$ M. (N-O) Formación de brotes múltiples en nudo cotiledonar con los tratamientos BAP 2,2  $\mu$ M – AIA 0,7  $\mu$ M y BAP 4,4  $\mu$ M a los 14 días.



Fuente: autor

Durante el proceso de regeneración los explantes mostraron una serie de cambios. Los primeros cambios morfológicos aparecieron a los 3 días de cultivo y se manifestó con el crecimiento del explante, una coloración verde y la formación callo a los 5 días en la zona de corte. Después de 7 días, los primeros brotes se formaron directamente de la zona no diferenciada de los explantes.

**Figura 11.** Medias de números de brotes respecto a cada tratamiento.



Fuente: autor

**Tabla 14.** Prueba de Tukey para número de brotes en nudos cotiledonares

N°brotes HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
Tratamiento	N° de brotes	Subconjunto
Control	4	0
BAP2,2	4	1,2
BAP 4,4 - AIA 0,7	4	1,7
BAP 2,2 - AIA 1,4	4	2,5
BAP 3,3	4	2,5
BAP 4,4 - AIA 1,4	4	3,0
BAP 3,3 - AIA 0,7	4	3,2
BAP 3,3 - AIA 1,4	4	3,7
BAP 2,2- AIA0,7	4	4,2
BAP 4,4	4	4,2
Sig.		,15

Las pruebas de las medias marginadas estimadas

La Prueba de Tukey nos indica que se dividieron en cuatro subconjuntos, donde el mejor subconjunto cuenta con los tratamientos BAP 2,2  $\mu\text{M}$  con AIA 0,7 $\mu\text{M}$  y BAP 4,4 $\mu\text{M}$  y los

tratamientos que no tuvieron una respuesta tan eficiente fueron BAP 2,2  $\mu\text{M}$  y BAP 4,4  $\mu\text{M}$  y AIA 0,7  $\mu\text{M}$ .

## 7.2 ENRAIZAMIENTO DE SEGMENTOS NODALES

Los segmentos nodales respondieron a los tratamientos entre los 8 y 10 primeros días (Tabla 15). El mejor tratamiento fue AIB 14,7  $\mu\text{M}$  (Tabla 15 y Figura 12) con una frecuencia de enraizamiento del 56 %, un número promedio de raíces de 3,4 y una longitud promedio de 1,4 cm al día 21. Los tratamientos que no promovieron el enraizamiento se encuentran aquellos compuesto por la auxina AIA en las concentraciones 5,7  $\mu\text{M}$  y 11,4  $\mu\text{M}$ .

Otros tratamientos que obtuvieron resultado, pero las frecuencias fueron menores están AIB 9,8  $\mu\text{M}$  y 4,9  $\mu\text{M}$  con un 22% y 11% de enraizamiento respectivamente y también AIA con una concentración de 16,5  $\mu\text{M}$  con un 11% (Tabla 15).

Varios explantes desarrollaron las raíces a partir de callos formados esto quiere decir a través de una organogénesis indirecta y otros segmentos nodales lo desarrollaron de forma directa como se puede observar en la Figura 12.

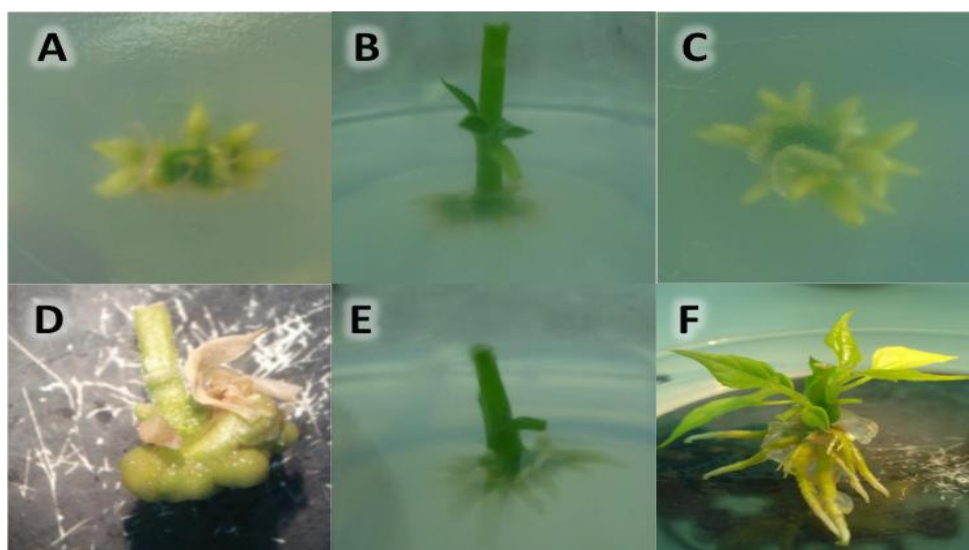
**Tabla 15.** Efecto de AIB y AIA a diferentes concentraciones en el enraizamiento de segmentos nodales.

Auxinas	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	DIE	Frecuencia de enraizamiento (%)	Promedio de raíces	Promedio de longitud por raíces (cm)
Control	0	0	0	0	0
AIB	4,9	8-10	11	0,2	0,5
	9,8	8-10	22	1	0,5
	14,7	8-10	56	3,4	1,41
AIA	5,7	0	0	0	0
	11,4	0	0	0	0

Auxinas	Conc. (μM)	DIE	Frecuencia de enraizamiento (%)	Promedio de raíces	Promedio de longitud por raíces (cm)
	16,5	8-10	11	0,2	2

Conc. (Concentración); DIE (Día de iniciación de enraizamiento).

**Figura 12.** (A-B). Segmentos nodales de *G.arborea* en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 μM a los 10 días; (C-D). Segmentos nodales de *G.arborea* en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 μM a los 18 días; E. Formación de callo en la base de un segmento nodal en un concentración de AIB 4,9 μM; F. Formación de raíces al día 21 con una concentración de AIB 14,7 μM.



Fuente: autor

### 7.3 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

Para esta etapa se evaluaron diferentes concentraciones de enzimas degradadoras de pared vegetal (celulasa y macerozima) y diferentes tiempos (2-12 h) sobre la cantidad de protoplastos obtenidos y su viabilidad. El aislamiento fue realizado a partir de hojas de plántulas de melina propagadas *in vitro*.

Para esto se realizaron 3 réplicas técnicas en el tiempo con el fin de verificar la reproducibilidad del ensayo. Donde el análisis mostró que cada una de las réplicas fue similar por lo tanto los datos obtenidos se agruparon y se llevó a cabo un solo estudio de las mismas.

Después de realizar la prueba de normalidad de Shapiro Wilks (Anexo 4) se encontró que los datos no se distribuyeron de forma normal por lo tanto se realizó la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 5) 1 (Tabla 16) mediante la cual se logró identificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y tiempos para cada una de las variables dependientes (número total de protoplastos y la viabilidad de los mismos), donde se encontró que la diferencia estadística fue significativa.

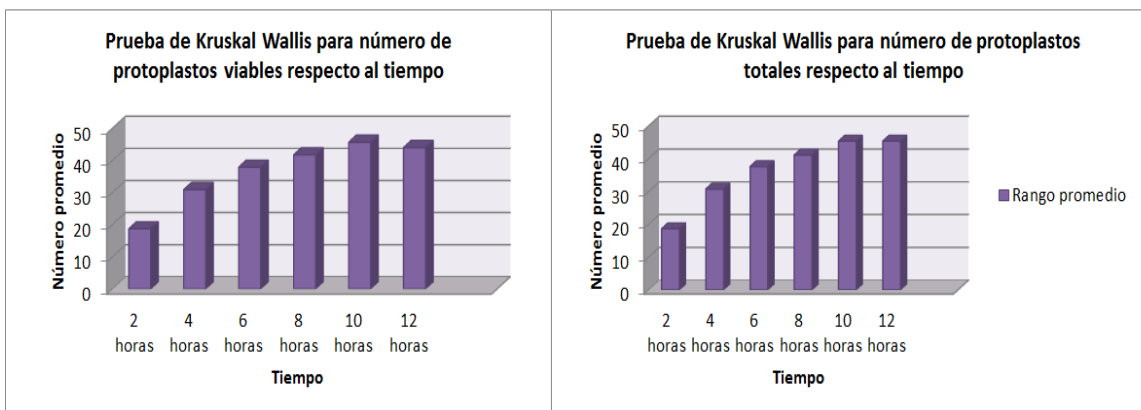
Luego de haber realizado esta prueba se llevó a cabo la prueba de Duncan (Tablas 17-20) mediante la cual se compararon las medias de los tratamientos para saber cuál fue el tratamiento óptimo. Donde el mejor tratamiento fue el número 3 que comprende celulasa 1.5% y macerozima 0.5%.

**Tabla 16.** Prueba de Normalidad para los protoplastos totales y viables.

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<b>totales</b>	,239	72	,000	,746	72	,000
<b>viables</b>	,237	72	,000	,754	72	,000

**7.3.1** Prueba de Kruskal Wallis para los protoplastos totales y viables respecto al tiempo: mediante la prueba de Kruskal Wallis se logró identificar si habían diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos para cada una de las variables dependientes (número total de protoplastos y viabilidad de los mismos) (Figura 13).

**Figura 13.** Prueba de Kruskall Wallis para número de protoplastos totales respecto al tiempo.



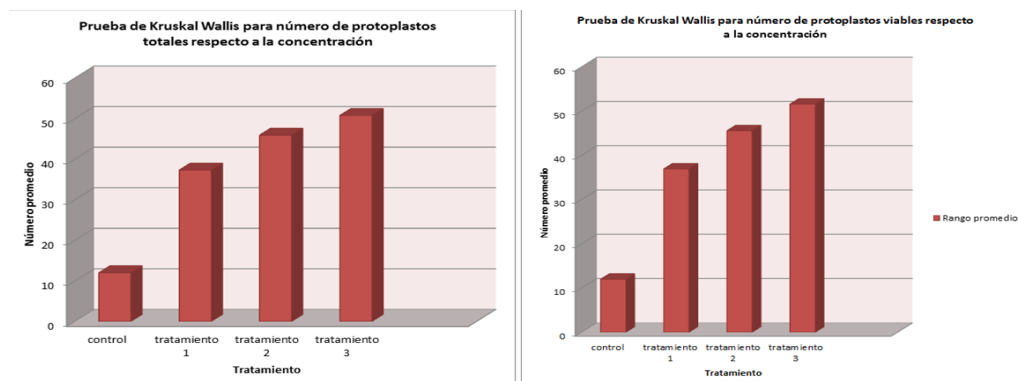
Fuente: autor

Para los protoplastos totales vs al tiempo se encontró que el mejor tiempo con mayor cantidad de rango promedio fue a las 10 y 12 horas con un rango promedio de 45,83 protoplastos y la que tuvo el menor rango promedio fue la hora 2 con 18,67 protoplastos (Anexo 5A). Sin embargo, se puede evidenciar que a medida que paso el tiempo el aislamiento de protoplastos fue mayor.

Para los protoplastos viables vs al tiempo se encontró que el mejor tiempo con mayor cantidad de rango promedio fue a las 10 horas con un rango promedio de 45,67 protoplastos y la que tuvo el menor rango promedio fue a la hora 2 con 18,71 protoplastos (Anexo 5B). A su vez estos reflejaron un comportamiento similar con los protoplastos totales.

**7.3.2 Prueba de Kruskal Wallis para los protoplastos totales y viables frente a los tratamientos enzimáticos:** mediante la prueba de Kruskal Wallis se logró identificar si habían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada una de las variables dependientes (número total de protoplastos y viabilidad de los mismos) (Figura 14).

**Figura 14.** Prueba de Kruskall Wallis para número de protoplastos respecto a concentración enzimática.



Fuente: autor

Para los protoplastos totales vs los tratamientos se encontró que el rango promedio de 50,78 fue el mayor el cual pertenece al tratamiento 3 (celulasa a 1,5% y macerozima a 0,5%) y el menor rango promedio además del control fue con el tratamiento 1 (celulasa al 0,5% y macerozima al 0,3%) con 37,31 protoplastos (Anexo 6A).

Para los protoplastos viables vs los tratamientos se encontró que el rango promedio de 51,56 fue el mayor el cual pertenece al tratamiento 3 (celulasa a 1,5% y macerozima a 0,5%) y el menor rango promedio además del control fue con el tratamiento 1 (celulasa al 0,5% y macerozima al 0,3%) con 36,92 protoplastos (Anexo 6B).

También, se observa que según las concentraciones enzimáticas en este trabajo fueron aumentando la liberación de los protoplastos también lo hacían.

**7.3.3 Cantidad de protoplastos:** se puede observar en la Figura 15 el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación y concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10. El tratamiento que permitió obtener el mayor número de protoplastos, fue el número 3 que corresponde a celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5% en un tiempo de 10 horas con una producción de  $9 \times 10^5$  protoplastos por mL en promedio.

**Figura 15.** Conteo de protoplastos durante 12 horas.





Fuente: autor

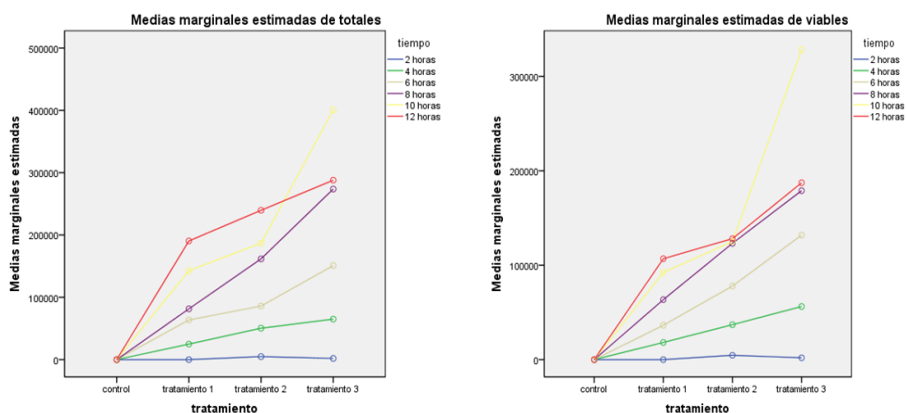
**7.3.4** Concentración enzimática vs número de protoplastos totales y viables: para evaluar las diferencias entre las concentraciones enzimáticas y el número de protoplastos totales y viables se realizó una prueba de Duncan (Figura 16 y Tablas 17-18).

En la prueba de Duncan realizada de los protoplastos totales respecto a los tratamientos se encontró que el mejor tratamiento fue el 3 a la hora 10. Sin embargo, se evidencia que todos los tratamientos en todas las horas evidencian un comportamiento en el que al aumentar la concentración mayor es el número de protoplastos aislados respecto al tratamiento anterior (Figura 16).

Para las horas 10 y 6 de los tratamientos 1 al 2 no existió una diferencia muy marcada en comparación con el tratamiento 3 donde hubo un gran cambio. La hora 8 presentó un comportamiento lineal respecto a los tratamientos (Figura 16).

La gráfica muestra que respecto a los protoplastos viables y los tratamientos para las horas 4, 6 y 8 los tratamientos tienen un comportamiento casi lineal a diferencia de los tratamientos 10 y 12 los cuales parecen que hasta el tratamiento 2 tienen un mismo comportamiento pero en el tratamiento 3 a la hora 10 tuvo un sobresaliente cambio respecto a los otros y a la hora 12 tiene una respuesta similar a la hora 8 en el tratamiento 3 (Figura 16).

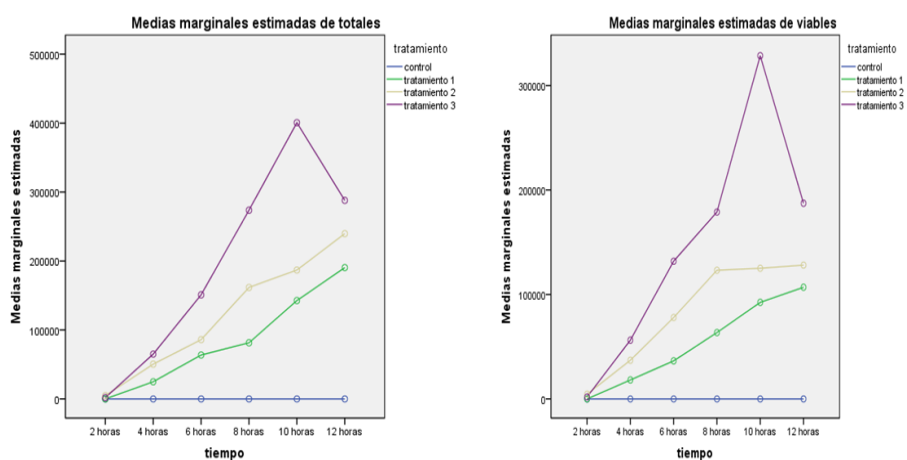
**Figura 16.** Prueba Duncan para número de protoplastos totales y viables respecto a concentraciones enzimáticas.



Fuente: autor

**7.3.5** Tiempo de incubación vs número de protoplastos totales y viables: se realizó una prueba de Duncan (Figura 17 y Tabla 19-20) para analizar el comportamiento del tiempo de incubación respecto al número de protoplastos totales y viables.

**Figura 17.** Prueba Duncan para número de protoplastos totales y viables respecto a tiempo de incubación.



Fuente: autor

En la prueba de Duncan realizada para los protoplastos totales respecto al tiempo el control en todos los tratamientos estuvo en cero, los tratamientos 1 y 2 tuvieron un comportamiento similar en el que se iban obteniendo mayor cantidad de protoplastos

según el paso del tiempo. Además, de esto se puede evidenciar que con el tiempo estos aún pueden seguir aislando hasta que llegue a un punto en el que ya no puedan aislar más o los protoplastos se rompan.

Sin embargo, el tratamiento 3 tuvo un comportamiento casi lineal hasta la hora 10 donde a la hora 12 hubo un descenso.

Para los protoplastos viables respecto al tiempo, también se evidencio que el tratamiento control no reflejó ningún aislamiento ya que este no tuvo ninguna enzima. El tratamiento 1 presentó aislamientos cada hora que fue evaluada de manera casi lineal solo a la hora 12 tiende a disminuir un poco. Para el siguiente tratamiento este avanzó de forma lineal, pero después de la hora 8 se normalizo el número de protoplastos para las horas 8,10 y 12. En el último tratamiento creció de manera de forma casi lineal hasta la hora 10 presentando una disminución de protoplastos viables en la hora 8, no obstante después de esta decreció la media marginal de protoplastos viables de casi 300000 a una menor de 200000 en la hora 12 (Figura 17).

Con respecto a la separación de grupos según la concentración que brindó la prueba de Duncan se encontró que los protoplastos totales se dividieron en 3 subconjuntos, los cuales se ubicaron de la siguiente forma el control en el primer subconjunto, los tratamientos 1 y 2 en el segundo subconjunto y el tratamiento 3 en el tercero (Tabla 17).

**Tabla 17.** Prueba de Duncan para protoplastos totales según el tratamiento.

Tratamiento	N	Totales Duncan <sup>a,b,c</sup>		
		1	2	3
control	18	,00		
tratamiento 1	18		83868,1	
tratamiento 2	18		121583,3	
tratamiento 3	18			196722,2
Sig.		1,00	,287	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 11046864366,320.

Usa el tamaño muestral de la media armónica=18000

Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleo la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

Alfa= ,05

Para los protoplastos viables se observaron 3 subconjuntos, los cuales permitieron identificar el tratamiento óptimo para el aislamiento de protoplastos viables. En el primer grupo quedó ubicado el control, para el segundo grupo están los tratamientos 1 y 2 (celulasa R10 0,5% y 1% y macerozima R10 0,3% y 0,4%), y el tercer grupo agrupo el tratamiento 3 (celulasa R10 1,5% con macerozima R10 0,5%). Esto indica que el tratamiento con mayor número de protoplastos viables obtenidos fueron celulasa R10 1,5% con macerozima R10 0,5% (Tabla 18).

**Tabla 18.** Prueba de Duncan para protoplastos viables según el tratamiento.

tratamiento	N	Viables Duncan <sup>a,b,c</sup>		
		1	2	3
control	18	,00		
tratamiento 1	18		52895,8	
tratamiento 2	18		82638,9	
tratamiento 3	18			147451,4
Sig.		1,00	,198	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 4683002604,167

Usa el tamaño muestral de la media armónica=18000

Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleo la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

Alfa= ,05

Para los protoplastos totales según el tiempo se observaron 3 subconjuntos, el primero es de las 2 horas a las 6 horas, el segundo está conformado de la hora 6 y la 8 y en el tercer grupo de encuentran la hora 8, 12 y 10. De este tercer grupo la mejor hora de aislamiento fue la hora 10 presentando una disminución a la hora 12 (Tabla 19).

Para los protoplastos viables se observaron 3 grupos, el primero es de las 2 y 4 horas, el segundo está conformado de la hora 4 hasta la hora 12 excluyendo la hora 10 y el tercer grupo contiene de la 6 a la 12, donde la hora 10 es la que obtiene mejores resultados. Igual que para el total de protoplastos en la hora 10 aumenta totalmente para en la hora 12 caer totalmente (Tabla 20).

**Tabla 19.** Prueba de Duncan para protoplastos totales según el tiempo.

tiempo	N	Totales Duncan <sup>a,b,c</sup>		
		Subconjunto		
		1	2	3
2 horas	12	1687,5		
4 horas	12	35083,3		
6 horas	12	75166,7	75166,7	
8 horas	12		129229,2	129229,2
12 horas	12			179510,4
10 horas	12			182583,3
Sig.		,112	,214	,248

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática(Error) = 11046864366,320

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = ,05

**Tabla 20.** Prueba de Duncan para protoplastos viables según el tiempo.

Viables					
Duncan <sup>a,b,c</sup>					
tiempo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
2 horas	12	1625,0			
4 horas	12	27854,2	27854,2		
6 horas	12		61541,7	61541,7	
8 horas	12			91395,8	91395,8
12 horas	12			105562,5	105562,5
10 horas	12				136500,0
Sig.		,353	,234	,143	,134

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = 4683002604,167

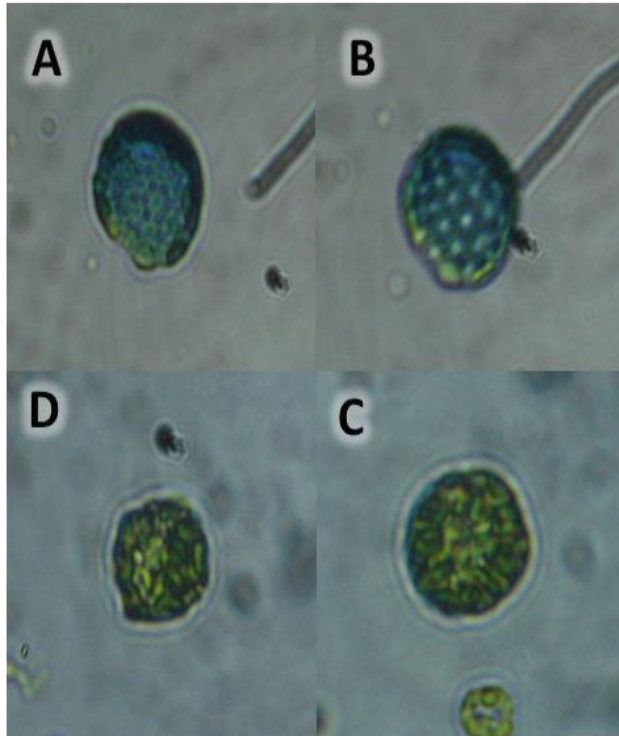
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = ,05.

**7.3.6** Prueba de viabilidad de protoplastos: para evaluar la viabilidad de los protoplastos, se empleó azul de Evans el cual permitió distinguir entre protoplastos no viables (teñidos de azul) (Figura 18 A y B) y viables (sin tinción azul) (Figura 18 C y D). El tamaño del protoplasto de melina es de aproximadamente 10  $\mu$ m (Figura 18 C).

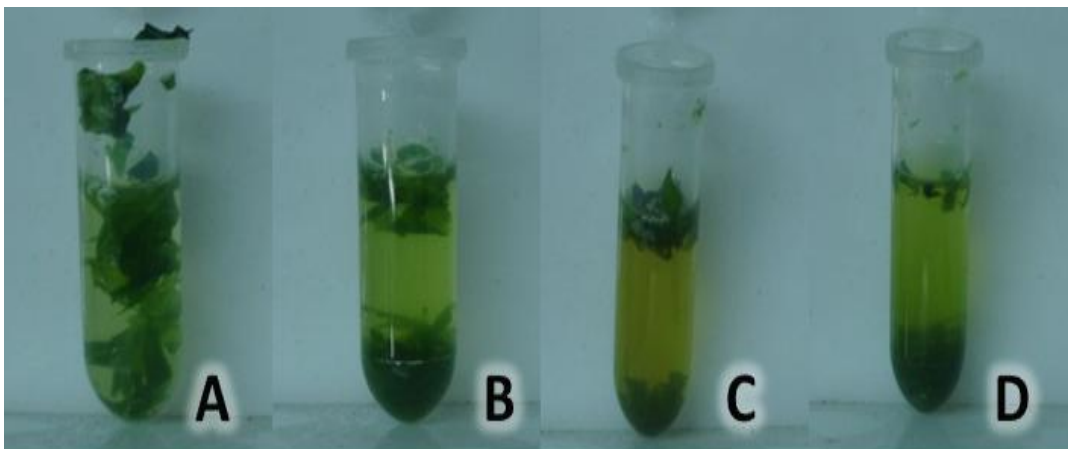
**Figura 18.** Viabilidad de protoplastos objetivo de 40X. (A – B). Protoplastos no viables; (C –D) protoplastos viables.



Fuente: autor

Durante el proceso de aislamiento de los protoplastos, las enzimas actuaron en las hojas presentando sedimentación creciente de los protoplastos según el tiempo de incubación, como se observa en la Figura 19. Según las fotos se puede decir que la disgregación celular se presentó claramente entre la hora 8 y la 10.

**Figura 19.** Proceso de sedimentación de los protoplastos en el tratamiento 3 (celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5%) . A. 2 horas; B. 6 horas; C. 8 horas; D. 10 horas.



Fuente: autor

## **8. DISCUSIONES**

### **8.1 REGENERACIÓN IN VITRO DE *Gmelina arborea***

Para desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* eficiente, el medio de cultivo es uno de los aspectos más importantes, ya que la composición del mismo es determinante para una respuesta óptima en los explantes. Dentro de los componentes más importantes están los RCV, especialmente la interacción entre citoquininas y auxinas que pueden ser utilizados desde cultivo de células hasta una planta completa (Santner et al., 2009) permitiendo que estas desarrollen caminos morfogénicos muy distintos (Steward & Krikorian, 1971). Estos caminos, pueden darse también, por el grado de ontogenia, dosis



de los RCV, las proteínas receptoras que existan en las plantas, genotipo, medio de cultivo, parte de la planta y etapa fenológica (Jiménez, 2001).

**8.1.1** Efecto de la combinación y distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento en la organogénesis: las células vegetales que cuentan con núcleo y tienen un grado de diferenciación relativo, el cual puede ser modificado por reguladores de crecimiento tales como las auxinas y las citoquininas, los cuales pueden modificar el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través de su totipotencia y acción sobre vías y pasos bioquímicos específicos donde bajo ciertas condiciones pueden revertirse a su estado meristemático y expresar luego diferentes respuestas (Takebe & Nagata, 1971; Steward et al., 1958).

Las auxinas son conocidas por estar involucradas en el desarrollo de la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de brotes axilares y adventicios y, con frecuencia, embriogénesis en los cultivos (Castañeda-Castro et al., 2009). Estas, poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de brotes axilares en los cultivos con callo, pero a su vez pueden favorecer la embriogénesis como se evidencio en los epicótilos (Campbell & Reece, 2005).

Dentro de las distintas expresiones que presentan las auxinas se encuentra la fase de acción rápida, donde se encuentra la elongación celular, esta es una de las respuestas hormonales más rápidas conocidas con un periodo latente de 10 a 25 minutos; y respuestas de término lento tal como la división celular, diferenciación y morfogénesis con un periodo latente de horas o días (Theologis, 1986). La iniciación de la división celular ocurre de 10 a 24 horas después de ser tratado con auxina y la diferenciación de las células vasculares en 3 días (Macdonald, 1997). Teniendo en cuenta esto se observa que los tratamientos en donde se usaron hojas y cotiledones tuvieron un mayor tiempo en dar respuesta que lo propuesto por Macdonald (1997), donde el tiempo en dar inicio a su transformación fue de 14 días, diferente a lo sucedido con epicótilos e hipocótilos donde su actividad inició a los 5 días. Sin embargo, el tiempo de inicio que se adecua a lo dicho por Macdonald (1997) se evidencia en el nudo cotiledonar en el cual la respuesta

se empezó a evidenciar a los 3 días.

Las concentraciones internas de las moléculas en las células vegetales son esenciales ya que las auxinas son activas a muy bajos niveles y alteraciones relativamente rápidas e importantes de la concentración de la auxina pueden ser necesarias conforme cambian las condiciones ambientales a las que está expuesta la planta (Vlaine, 1999). Al existir cambios en las concentraciones internas del RCV se puede ver modificaciones en la tasa sintética de la molécula, la tasa de transporte hacia dentro o afuera de las células, la tasa de degradación de la molécula, la formación de compuestos conjugados o la liberación de conjugados existentes (Vlaine, 1999).

Otro regulador de crecimiento vegetal de importancia es la citoquinina que influye en la expresión de las plantas, en cuanto a su capacidad de estimular la división celular, el crecimiento y el desarrollo. Un ejemplo de esto es la BAP, donde a concentraciones elevadas (1.0 a 10 mg/L), induce la formación de brotes adventicios, inhibe la formación de raíces y retarda el envejecimiento (Pierik, 1990).

Como se mencionó anteriormente, el uso de la auxina sola no influye directamente en la dediferenciación y diferenciación de las células, sino que es más el uso de las citoquininas son de gran importancia para la regeneración; esto se puede explicar a la luz de que en cada especie existe un balance entre auxinas y citoquininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos (Castañeda-Castro et al., 2009).

Experimentos previos han demostrado que la respuesta de las citoquininas para la iniciación de células madre de novo y el establecimiento de los meristemas es de gran valor (Gordon et al., 2009). En una investigación realizada en melón con un medio sin BAP, evidencio la no formación de brotes, lo que significó que la BAP promueve fuertemente la inducción de callos, brotes y el desarrollo de callos compactos y embriogénicos (Zhang et al., 2011).

Medio MS basal suplementado con citoquininas en altas concentraciones y auxinas en

bajas concentraciones o algunas veces sin estas soporta la regeneración de plántulas con una frecuencia alta, como ejemplo de esto tenemos lo realizado en *Tectona grandis* (Baghel et al., 2008), caña de azúcar (Castañeda-Castro et al., 2009), yuca (Marin et al., 2009), *Gmelina arborea* (Madke et al., 2012; Behera et al., 2008; Kannan & Jasrai, 1996; Yang et al., 1993), crisantemo (Teixeira, 2003), entre otras especies.

En el trabajo realizado por Kannan & Jasrai (1996) y Yang & colaboradores (1993) en *Gmelina arborea* se observó que concentraciones de BAP causaron pronunciadamente la formación de callo en los extremos de los segmentos nodales cortados, como se pudo observar para los hipocótilos, epicótilos, hojas y cotiledones y un poco en los nudos cotiledonares que iniciaron su proceso de regeneración a través del callo. Esto puede deberse al contacto que existió entre los reguladores de crecimiento endógenos con los reguladores exógenos, donde el trabajo en conjunto de las auxinas y las citoquininas permitieron la desdiferenciación seguida de una diferenciación de las células del explante para nudos cotiledonares.

La producción de callo en los distintos explantes, también puede ser resultado de la combinación de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas las cuales suelen dar varias respuestas por la presencia relativamente alta de ambos reguladores lo que conduce a una multiplicación celular con escasa división por lo tanto a una baja diferenciación (Valdez & Gatica, 2009; Gaspar et al., 2003; Skoog & Miller 1965). Sin embargo, cuando los niveles de los reguladores son adecuados, estos permiten el desarrollo de brotes tal como se observó en los nudos cotiledonares. Estos resultados coinciden con lo señalado por Marín & colaboradores (2009); Litz & Jarret, (1991); quienes reportan que en algunos explantes los factores endógenos pueden variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales y el genotipo para inducir una respuesta morfogénica requerida.

En el trabajo realizado por Madke & colaboradores (2012), se evaluaron diferentes concentraciones de las citoquininas BAP y Kinetina, solas o en combinación con las auxinas ANA y 2,4D, donde obtuvieron como respuesta que explantes como las hojas y

los epicótilos desarrollaron callo pero los cotiledones y los hipocótilos no dieron ninguna respuesta. En el presente trabajo, los explantes que presentaron una frecuencia de callogénesis más alta y en menor tiempo fueron los hipocótilos y los epicótilos. Esta diferencia puede deberse a que Madke & colaboradores (2012) usaron a ANA como auxina y en este caso se utilizó a AIA. El efecto positivo del AIA sobre los explantes puede deberse a que esta auxina cuenta con vías metabólicas y de transporte propias, por lo que la toma, transporte y actividad de esta auxina por el explante podría ser mucho más efectiva que la toma o actividad del ANA o del 2,4 D, que además son auxinas sintéticas a diferencia de la AIA (Gaspar et al., 2003).

En el año 2008, Behera & colaboradores, realizaron un trabajo en regeneración *in vitro* de melina a partir de nudos cotiledonares donde evaluaron las citoquininas BAP y TDZ solas y en combinación con las auxinas AIA y ANA. Donde el mejor tratamiento fue BAP 4,4  $\mu\text{M}$  – AIA 1,4  $\mu\text{M}$ , seguido del tratamiento BAP 4,4  $\mu\text{M}$ . En el presente trabajo, como se mencionó, los mejores tratamientos en nudos cotiledonares fueron BAP 2,2  $\mu\text{M}$  – AIA 0,7  $\mu\text{M}$  y BAP 4,4  $\mu\text{M}$ , lo que coincide en gran medida con este antecedente (balance entre reguladores de crecimiento). En este mismo estudio, se menciona que menores concentraciones de AIA junto con concentraciones mayores de BAP mejoran la frecuencia y el número de brotes por explante, similar a lo observado en nuestro caso. Aunque el tratamiento con mayor eficiencia de regeneración no fue el mismo que el obtenido por Behera & colaboradores (2008), se mantuvo la relación BAP/AIA con lo que nuestros resultados verifican y soportan este trabajo previo.

En el trabajo realizado por Teixeira (2003), donde las diferencias en cuanto a la regeneración de las variedades Indianápolis y Texana concordaron con los resultados obtenidos de otras variedades, soporta el papel importante que juegan las citoquininas y las auxinas en la obtención de brotes.

Para confirmar que los nudos cotiledonares fueron los únicos que presentaron brotes, Kaul & colaboradores (1990) determinaron que existen diferentes respuestas de los explantes cortados de tallo y hoja, debido particularmente a la concentración de

auxinas y citoquininas exógenas que poseen; además de esto también explican que el efecto de los diferentes niveles endógenos de reguladores en los tejidos, afectan la respuesta de los reguladores aplicados exógenamente.

**8.1.2** Potencial morfogenético de los explantes: la respuesta morfogénica de cualquier tipo de explante está directamente relacionada con varios factores, entre los que se encuentran su edad fisiológica, posición, genotipo, tamaño y tejido u órgano del que es extraído, al igual que el estado fisiológico de la planta madre, por lo que es necesario evaluar estos factores para determinar las características de los ensayos (Litz & Jarret, 1991). Por consiguiente en esta investigación se tuvo en cuenta que las plantas madre fueran plantas jóvenes de una semana de crecidas, con buenas características fisiológicas, esto con el fin de obtener explantes potencialmente morfogénicos y claramente resultados para regeneración.

Aunque que se hizo un ensayo totalmente al azar, se tuvo en cuenta el tamaño del explante, factor que pudo influir en la respuesta de los explantes, ya que en general, se considera que los explantes de mayor tamaño poseen mayor potencial regenerador en comparación con los explantes pequeños que no tienen esta misma habilidad, por lo tanto, la producción de brotes puede tender a ser bajas, aunque también se han realizado procesos de regeneración con células (Jiménez et al., 2001).

**8.1.2.1** Tipo de tejido y juventud del explante: la elección del tejido del cual se parte para realizar la regeneración puede ser cualquier célula, tejido u órgano donde la respuesta puede ser variable (Flick et al., 1983). Según Marthur & Koncsz (2005) explantes como la raíz e hipocótilos son materiales excelentes para la iniciación de organogénesis en contraste con tejidos como las hojas, sin embargo, para que el desarrollo sea exitoso en cultivo *in vitro* este debe adaptarse a las condiciones brindadas, ya que el exponer al explante de esta forma puede generar estrés, alterar el metabolismo celular (Cardoza, 2005) y la expresión de los reguladores se puede ver afectada (Litz & Jarret, 1991).

Gao & colaboradores (2001) y Himstedt & Jacobsen (2001) compararon la capacidad

morfogenética de hoja y tallo, y encontraron una mayor capacidad de regeneración en tejidos de tallo que de hoja. Texeira (2003) en los explantes que provinieron de tallo mostraron mayor capacidad de regeneración que los pecíolos y las hojas, en un intervalo de dos a 10 brotes por explante, aunque de igual manera el genotipo puede afectar la respuesta.

Texeira (2003) también en las seis variedades de crisantemo evaluadas con 12 combinaciones hormonales, únicamente las variedades Indianápolis y Texana regeneraron brotes adventicios a partir de segmentos internodales de tallo. Ambas variedades que si regeneraron, lo hicieron bajo diferentes combinaciones de BAP (2mg/L y 3mg/L) y AIA (1mg/L y 1,8 mg/L).

Estos estudios apoyan los resultados presentados ya que mejores resultados se obtuvieron de explantes provenientes del tallo (hipocótilos, epicótilos y nudo cotiledonar) a diferencia de los que provinieron de cotiledones y hojas.

**8.1.2.2 Juventud del explante:** la juventud del explante es de gran importancia porque este facilita la regeneración de las plantas. Miyazaki & Tashiro (1978) registraron que los segmentos de tallo de *Chrysanthemum morifolium* cv. Kayono-sakura, obtenidos de plantas jóvenes de nueve semanas, produjeron brotes adventicios con mayor facilidad que los obtenidos de plantas más viejas (19 semanas).

**8.1.2.3 Posición:** es conocido, que el destino de una célula está determinado por su posición y no por su línea clonal, confirmándose que las células deben ser capaces de detectar su posición relativa a otras células, tejido y órganos. La mayoría de pruebas apoyan la idea de que el destino de una célula no depende del linaje celular, sino que está determinado por la información de su posición (Wojtaszek et al., 2004).

Las células en las plantas pluricelulares normalmente están en estrecho contacto con otras a su alrededor, y el comportamiento de cada una esta cuidadosamente coordinado con el de sus vecinas a lo largo de la vida de la planta, además, cada célula ocupa una

posición específica en el tejido y órgano al cual pertenece. Pero gracias a la existencia de señales químicas que facilitan la comunicación entre células, tejidos y órganos ayudan a regular el crecimiento y el desarrollo a través del control en los patrones de división, expansión, diferenciación y metabolismo celular donde el efecto depende de la concentración y sensibilidad de los tejidos (Taiz & Zeiger, 2006).

Hay evidencias que revelan que debido a la ruptura de tejido vascular entre las hojas y el tallo principal, se evita el transporte de citoquininas, las cuales se acepta que son sintetizadas en los meristemos de las raíces y se transportan por xilema hacia la parte aérea vegetal (Fernandez, 2002) esto hace pensar que la cantidad de citoquininas presentes durante el experimento fueron mayores en los nudos cotiledonares, hipocótilos y epicótilos, que en las hojas y cotiledones.

Además es conocido que las plantas desarrollan meristemos secundarios durante el desarrollo postembrionario. Estos tienen una estructura similar a los meristemos primarios, aunque algunos tienen estructuras bastante diferentes. Entre estos meristemos encontramos los axilares, los de inflorescencias, los laterales (el cambium vascular y suberogeno), y los intercalares. Dentro de los explantes usados es posible que meristemos intercalares y laterales hayan influido en los procesos de regeneración, ya que los primeros se encuentran dentro de los órganos y con frecuencia cerca de su base como por ejemplo la posición del nudo cotiledonar. Es sabido que estos dentro de las hojas y tallos de herbáceas les permiten continuar su crecimiento a pesar de ser ingeridas por herbívoros. Ahora dentro de los laterales encontramos aquellos que se encuentran en el cambium vascular el cual se forma junto al tejido primario a partir del procambium en el cilindro vascular (Segura A, 2000).

Pérez (1998) comenta que el porcentaje de células de un explante que contribuyen a la formación de callos es bajo, y estas se suelen encontrar en la superficie del explante, o en la zona lastimada del mismo; por eso para poder obtener callos en tiempos reducidos es de gran importancia utilizar explantes jóvenes, cuya renovación celular sea alta.

**8.1.2.4 Genotipo:** el genoma de la planta es el conjunto de información genética contenida en el ADN del núcleo, de las mitocondrias y de los cloroplastos. En conjunto, se tiene una cantidad enorme de información, mucha más de la que realmente se utiliza, cuya expresión es regulada en tiempo y espacio y determina el éxito en la formación de un organismo.

La regulación de los genes involucra la percepción de las características del ambiente externo (radiación, temperatura, etc.) e interno (redox, pH, concentración de azúcares, etc.) de la planta. Al percibir cambios en el ambiente la planta inicia actividades para adaptarse a dichos cambios, la cual depende en turno a la expresión regulada de los genes.

La percepción de un estímulo, por medio de un receptor adecuado, desencadena una cascada de señales que originan la síntesis de ciertos compuestos, la modificación en la concentración de otros y cambios en las propiedades de las membranas, entre otros procesos. La señal ambiental es traducida a una señal bioquímica o fisicoquímica por la acción de diferentes transductores (Senger & Schmidt, 1986).

Al igual que ocurre con las señales de la radiación transducidas por los fotoreceptores, que regulan la síntesis o actividad de enzimas específicas, las señales bioquímicas internas como el nivel de carbohidratos (Jang & Sheen, 1994), el potencial redox en compartimientos subcelulares (Allen et al., 1995) o el pH y la cantidad de protones libres (Salisbury & Ross, 1992) también son capaces de inducir cambios en la expresión de los genes o bien modificar postranscripcionalmente la actividad de enzimas, reguladores del crecimiento, absorción y asimilación de nutrientes minerales (Benavides, 1998).

El crecimiento organizado y la formación de los diferentes órganos de la planta requiere de la represión o de la expresión diferencial de cierta información genética, cuando esto ocurre se dice que la planta expresa un programa de desarrollo. La expresión de genes que codifican factores de transcripción determina la identidad de la célula, tejido y órgano. Las rutas de desarrollo están controladas por redes de genes que interactúan



entre sí (Scheres, 2001). Así que el desarrollo está regulado por la señalización célula a célula, esto es confirmado por Santalla & colaboradores (1998) los cuales afirman que los factores genéticos son de gran importancia en los efectos que se tienen como respuesta del cultivo *in vitro*.

La coordinación de la actividad celular requiere la comunicación célula a célula. Es decir, que algunos genes importantes del desarrollo actúan de forma no autónoma. De esta forma no tienen por qué expresarse en una célula dada para afectar el destino de esa célula. Un gen o grupo de genes determinados puede ejercer efecto sobre el desarrollo de las células vecinas o incluso de células de tejidos distantes a través de la señalización inducida por ligando, hormonal, transporte de proteínas reguladoras y/o mRNA (Taiz & Zeiger, 2006).

Con base en análisis genéticos y moleculares de mutantes con afección en la formación de callos, se ha puesto en manifiesto que la inducción de estos se rige a través de complejos mecanismos de regulación. La progresión de ciclo celular mitótico es suprimida en células vegetales diferenciadas terminalmente, por lo que estas readquieren competencia proliferativa como característica central en la formación del callo. La activación de un solo regulador del ciclo celular, quinasas dependientes de ciclinas, por si solos no son suficientes para inducir la formación de callos (Dewitte et al., 2003). En consecuencia la mayoría de los procesos de inducción de callo descritos hasta la fecha emplean reguladores que afectan procesos transcripcionales o post transcripcionales los cuales causan cambios globales en la expresión génica o en la traducción de proteínas.

A pesar de que todas las células vegetales contienen información idéntica, los callos derivados de células somáticas varían en cuanto a su competencia de expresar la totipotencia y su proceso de diferenciación. La mayoría de los explantes que contienen células meristemáticas desarrollan callo, lo cual expresa su competencia (Baghel et al., 2008). Sin embargo, cuando se da una formación de callo, se origina un incremento en la frecuencia de cambios genéticos, especialmente si se produce una poliploidia o

una aneuploidia tal como se evidencia en los estudios realizados en *Alnus acuminata* (Gonzaga & Moreno, 2005).

Muchos factores inducen el desarrollo de nuevas estructuras vía organogénesis, esto ha demostrado que la capacidad regenerativa y las repuestas a las condiciones de crecimiento se deben a la especie y su genotipo como lo reportado en *Tectona grandis* (Baghel et al., 2008) *Helianthus annuus* (Deglene et al., 1997) y *Solanum melongena* (Sharma & Rajam, 1995).

Los epicótilos y los hipocótilos fueron los explantes que, después de los nudos cotiledonares tuvieron respuesta generando callos, estos fueron en tiempos cortos: estos comenzaron entre los 5 primeros días hasta el día 14. Esta variación en los tiempos de respuesta tan distante puede deberse tanto al tratamiento como al genotipo, debido a que existió variación dentro de un mismo tratamiento. También cada célula dentro del explante tiende a reaccionar diferente respecto a diferentes cambios ambientales facilitando o no la desdiferenciación de células meristemáticas que posteriormente tomaran nuevas vías de desarrollo.

Después entre los días 11 y 14 se observó la respuesta de callogénesis en las hojas y en los cotiledones, aunque no todos los tratamientos en este caso obtuvieron respuesta, se pudo deber al poco tiempo al que estuvieron sometidos e igualmente a la capacidad y la posición que tienen las células dentro de cada explante para poder desdiferenciarse y tomar nuevas vías de desarrollo en conjunción con concentraciones acertadas de reguladores de crecimiento, sin olvidar el genotipo de cada planta usada en el experimento.

La frecuencia de regeneración de Melina fue de un 100% en casi todos los tratamientos a excepción de los tratamientos BAP 2,2 uM y BAP 3,3 uM – AIA 0,7 uM con un 50% de regeneración, y del tratamiento control (0% de regeneración). Esto evidencia el alto potencial morfogénico de este explante y su idoneidad en regeneración *in vitro*, lo cuál ha sido ampliamente reportado en diferentes especies.

El crecimiento de los brotes se presentó en tiempos muy cortos entre los primeros 5 días. Este desarrollo de los brotes estuvo asociado al desarrollo de un poco de callo, lo que coincide con reportes previos (Behera et al., 2008). Algunos de los explantes desarrollaron organogénesis directa otros no, esto fue independiente del tratamiento, por lo que se deduce que es dependiente del genotipo.

Los resultados de regeneración *in vitro* obtenidos a partir de nudos cotiledonares son muy alentadores debido a la rapidez de la respuesta morfogénica como al alto número de brotes múltiples obtenidos a los 14 días (4.25 brotes por explante en promedio). Este resultado es de gran importancia de cara al desarrollo de protocolos de transformación genética en melina, y dejan presagiar que podrá ser posible obtener plantas transformadas de melina en tiempos relativamente cortos, algo deseable y poco frecuente en una especie forestal.

## **8.2 ENRAIZAMIENTO**

Debido a que las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otros reguladores de crecimiento vegetal.

Diversos bioensayos han sido descritos para analizar respuestas a auxinas, los cuales han sido útiles en la identificación de compuestos con actividad típica de auxinas y de plantas mutantes con defectos en la síntesis, metabolismo o respuestas a auxinas. Uno de los ensayos que caracterizan el efecto de auxinas en el desarrollo, es la regulación del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario (Jenik & Barton, 2005). Mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleóptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias.

En técnicas de cultivo de tejidos se utilizan auxinas y citoquininas para promover la

división celular y la diferenciación de raíces y tallos, respectivamente. Las auxinas estimulan la división de células localizadas en el periciclo en la zona justo arriba de la zona de elongación para provocar la formación de raíces laterales. Este fenómeno también se aplica en la formación de raíces adventicias la cual puede ocurrir en varios tejidos donde existan un grupo de células en activa división (Jordan & Casaretto, 2006).

A nivel de tallo empezarán a ocurrir una serie de cambios morfológicos durante la formación de raíces adventicias. El conjunto de estos cambios puede ser dividido en las siguientes cuatro etapas: Desdiferenciación de cierto grupo de células maduras, formación de raíces iniciales de raíz a partir de las células cercanas a los haces vasculares las cuales debido al fenómeno de desdiferenciación han adquirido propiedades meristemáticas, desarrollo de estos iniciales de raíces conformando primordios de raíces organizados, emergencia de estos primordios radiculares ya desarrollados a través del tejido del tallo y la formación de conexiones vasculares entre estos primordios y el sistema vascular del propio segmento nodal (Davies, 2013).

Dentro del proceso de formación de raíces adventicias se ha creído que éste es dependiente de la formación previa de una masa irregular conformada por células de parénquima denominada callo. Pero, se ha probado que en la mayoría de plantas la formación de callo es independiente de la formación de raíces adventicias y si ocurren simultáneamente es debido a que ambos están condicionados por los mismos factores ambientales que los rodean (Davies, 2013).

Una vez que se realiza la iniciación de raíces adventicias, se desarrolla una actividad metabólica considerable, a medida que nuevos tejidos y raíces crecen a través y fuera de los tejidos de tallo para convertirse en raíces externas funcionales. Un ejemplo de esto es lo que se evidencia en *Salix tetrasperma* donde la producción de ARN participa indirectamente en el desarrollo de raíces adventicias en segmentos de tallo (Davies, 2013).

El hecho de que la acción de la auxina requiera la presencia de factores nutricionales

(glucosa) es debido al requerimiento de una fuente de carbono para la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas (Davies, 2013).

Se distingue en las plantas que estas pueden obtener AIA a partir de una reacción de  $\beta$ -oxidación de AIB, la segunda auxina más abundante, que ocurriría en los peroxisomas. Así como el AIA, el AIB también puede ser conjugado a través de uniones de amidas o ésteres (Bartel et al., 2001).

El AIB fue clasificado inicialmente como una auxina sintética, pero actualmente es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que el AIA en promover la formación de raíces laterales y el cual es usado comercialmente con este propósito (Galarraga, 2003). El ácido indolbutírico (AIB) se utiliza para causar la formación de raíces aún más a menudo que ANA o cualquier otra auxina.

En este trabajo se observó que la formación de las raíces es precedido por la formación de callo, similar a lo reportado por otros estudios (Behera et al., 2008, Surkartiningsih & Ide, 1999). Este resultado coincide con reportes previos que sugieren que el AIB tiene efectos positivos para la inducción de raíces (Kannan & Jasrai, 1996; Yang et al., 1993). En el trabajo de Behera & colaboradores (2008) el mejor tratamiento fue IBA 4,9  $\mu\text{M}$  + TIBA 2,0  $\mu\text{M}$ , con una frecuencia de enraizamiento de 66,6%, un promedio de 3,2 raíces y un promedio de longitud de 2,2 cm; Madke & colaboradores (2012) reportan a su vez que el mejor tratamiento fue IBA 14,7  $\mu\text{M}$  con efecto de enraizamiento de 7 a 10 días y una frecuencia de 80 %. Con base en estos reportes, se puede decir que en este trabajo se tuvo respuestas similares a lo obtenido por Madke & colaboradores (2012), sin embargo la frecuencia fue ligeramente menor en un 24%. Una de las razones a las que se puede deber esta disminución es a los subcultivos, los cuales pudieron haber afectado la respuesta de inducción de raíces, de acuerdo a lo reportado por Naik & colaboradores (2003). Otra causa puede ser que la altitud de la ciudad de Bogotá (2600 msnm) haya afectado el crecimiento y desarrollo de la especie, así se trate de un cultivo *in vitro*. En cuanto a la diferencia evidenciada con lo realizado por Behera & colaboradores (2008) puede deberse a que el uso de TIBA junto a IBA genera una mejor inducción

de rizogénesis que él IBA solo y en mayores concentraciones, sin embargo esto requeriría ser evaluado dentro de un mismo ensayo y diseño experimental.

### **8.3 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS**

Las células vegetales están compuestas por una pared celular, la cual tienen una estructura altamente ordenada, formada principalmente por celulosa, hemicelulosas y pectinas con lignina, cuando la pared lleva un desarrollo avanzado (Cosgrove, 2005). La identidad exacta y la abundancia relativa de cada uno de estos polímeros pueden variar en la misma planta, sujeto a la edad, el tejido y el estado de crecimiento (Chen, 2014).

Cabe mencionar que estos proveen resistencia al estrés mecánico, forma de la célula y la protección de patógenos al mismo tiempo, además de que son flexibles para oponerse a las fuerzas de corte, y permeables para permitir el paso de señales de moléculas dentro de la célula.

La celulosa, es el polímero natural más abundante, es altamente estable e insoluble en agua. Es conocido principalmente como componente estructural de las paredes celulares de las plantas y las algas, adicionalmente la celulosa también es generada por especies tales como los tunicados y varias bacterias (Quiroz & Folch, 2011). En la naturaleza es raro encontrar celulosa sola, ya que estas usualmente forman filamentos desde que son sintetizadas. Estos filamentos, son denominados microfibrillas, que pueden contener de 36 a más de 1200 cadenas de celulosa con diámetros de entre 5 a 15 nm (Quiroz & Folch, 2011).

La hemicelulosa constituye del 25 al 30% del peso seco. Los xilanos son los componentes más abundantes de las hemicelulosas su composición exacta y la frecuencia de bifurcación depende del origen de las hemicelulosas (Quiroz & Folch, 2011). Por ejemplo en bosques caducifolios tales como el de poplar, abedul y olmo, la hemicelulosa es formada principalmente por los xilanos donde el 60 y el 70% de los residuos son acetilados, mientras que los bosques de madera blanda de coníferas tales

como el pino y el cedro lleva hemicelulosas compuestas principalmente de glucómanos (Quiroz & Folch, 2011). Dentro de los roles más importantes de las hemicelulosas se encuentran la unión de las ligninas y las fibras de celulosa, las cuales son las encargadas de proveer rigidez a la mezcla de celulosas, hemicelulosas y ligninas (Quiroz & Folch, 2011).

En investigaciones en las cuales los protoplastos son punto a estudiar, es importante resaltar que los diferentes procesos a los que son sometidos durante el aislamiento, pueden tener un efecto deletéreo que se debe disminuir mediante una cuidadosa manipulación de los diferentes factores que intervienen en el proceso (Rivera & Perea, 2004).

Dentro de los procesos traumáticos que se llevan a cabo en el desarrollo del aislamiento de los protoplastos, se encuentra la remoción de la pared, por esto es recomendable estabilizar la membrana citoplasmática mediante el empleo de una solución de preplasmólisis, previa al tratamiento enzimático (Rivera & Perea, 2004).

Sin embargo, junto a la combinación y concentración de las enzimas concurren otros aspectos que condicionan el resultado final. Entre éstos, se ha puesto en manifiesto el papel que tiene el estado fisiológico tras un periodo de oscuridad, y cómo el alargamiento de este periodo hasta 7 días mejora el número de protoplastos obtenidos en el aislamiento. Los cambios producidos tras ese período de oscuridad pueden tener un papel importante en facilitar la digestión de la pared y/o en la estabilidad posterior del protoplasto, una vez aislado (Langford & Wainright, 1988).

Al igual que en el presente trabajo, Jadan & colaboradores (2004) llevaron a cabo el aislamiento de protoplastos a través de una técnica que consistió en la aplicación de tres tipos de purificación (filtración, centrifugación directa y diferencia de gradientes en dos fases), en estas etapas Jadan usó el medio BH3 en este trabajo se usó los medios descritos por (Lin et al., 2014; Guo et al., 2012), además del uso de la sacarosa y el manitol como estandarizadores osmóticos, en el trabajo desarrollado se uso manitol

como estabilizador osmótico.

**8.3.1 Explante:** por otra parte, la selección de explantes que provienen de plántulas *in vitro* facilita la utilización de abundante material homogéneo, libre de contaminantes, evitando la aplicación de agentes desinfectantes que pueden tener un efecto negativo en la viabilidad de los protoplastos. La utilización de hojas primarias y cotiledones jóvenes como fuente de protoplastos puede facilitar la obtención de grandes cantidades de protoplastos viables. Además, las células del mesófilo joven tienen mayor capacidad para tolerar los tratamientos traumáticos y mantener su totipotencia (Rivera & Perea, 2004).

En el aislamiento de protoplastos a partir del mesófilo de tomate, las plantas *in vitro* son preferidas a las de maceta, debido a que sus hojas poseen cutícula y pared más delgada, lo cual facilita el proceso de digestión de la pared celular. Esto se corrobora a través de los ensayos preliminares realizados con hojas de plantas mantenidas en la estación biológica de la Universidad de Antioquia, las cuales dieron como resultado a muy pocos protoplastos obtenidos (Botero-Giraldo et al., 2011).

Diferentes autores afirman que el aislamiento y obtención de protoplastos es específico para cada especie (Divakaran et al., 2008; Rizkalla et al., 2007; Schum et al., 2001; Szczerbakowa et al., 2000; Szabados, 1991); al igual que cada genotipo responde de manera diferente a las concentraciones enzimáticas y al tiempo de incubación del tejido foliar. Esto se puede evidenciar en el trabajo realizado en tomate donde el genotipo resistente a *P. infestans*, requirió menores concentraciones enzimáticas de celulasa 0,6% y pectinasa 0,1%, y en el genotipo susceptible a *P. infestans*, fue necesaria mayor concentración enzimática, celulasa 4% y pectinasa 0,4%. También se vio reflejado en los aislamientos de protoplastos del mesófilo en el género de *Lycopersicon*. Donde para *L. esculentum* fue de una eficiencia entre 2,5 a  $5 \times 10^5$  protoplastos por un gramo de hoja (Kulawiec et al., 2003) y para *L. cheesmanii* el aislamiento altamente eficiente de protoplastos con una producción media de  $3 \times 10^7$  protoplastos por gramo de hoja (Dorion et al., 1999). Davey & colaboradores (2005) afirman que, generalmente, la densidad óptima de protoplastos es de  $5 \times 10^2$  -  $1,0 \times 10^6$  protoplastos/ml para un cultivo exitoso,



dependiendo de la especie/cultivar.

**8.3.2 Temperatura:** es bien conocido que la temperatura es de gran influencia para el buen funcionamiento de las enzimas y los medios osmóticos utilizados en el aislamiento; para el aislamiento de protoplastos de Melina se usó una temperatura de 27°C y al manitol como regulador osmótico. En análisis con la temperaturas usadas en otros estudios se encontró que en un estudio realizado en trigo por Sethi & Maeda (1983) se observa que el medio BH3 que sirve como regulador osmótico, pierde viabilidad a temperaturas altas (27°C a 30°C) conforme pasa el tiempo a partir de las seis horas de incubación.

Estudios realizados por Chawla (2002) y Jadán & colaboradores (2004) se demuestra que las mejores temperaturas para la acción enzimática se encuentran entre 26 y 28°C, por lo que se tomó una temperatura intermedia, a lo que se atribuye una generación de protoplastos más rápida en comparación con el estudio de Duquenne & colaboradores (2007) en trigo.

**8.3.3 Concentración enzimática:** Las cadenas de celulosa están unidas por microfibrillas a través de enlaces de hidrogeno y la fuerza de Van der Waals, formando una estructura cristalina y organizada que es refractoria a la hidrólisis en ciertas áreas. Las regiones altamente ordenadas y cristalinas están entremezcladas con regiones que contienen celulosas amorfas y desorganizadas, las cuales constituyen del 5 al 20% de las microfibrillas, estas regiones amorfas son más susceptibles a la degradación enzimática (Quiroz & Folch, 2011).

La concentración enzimática es de gran importancia en el aislamiento de protoplastos ya que esta permite que los protoplastos sean aislados fácilmente y no existan daños severos a las células, debido a esto se utilizaron diferentes concentraciones (macerozima R10 (0,3; 0,4; y 0,5%) y celulasa R10 (0,5; 1 y 1,5%) y el control que no dispuso de enzimas) con distintos tiempos para proceder a un análisis estadístico donde

se tomaron muestras desde la hora dos hasta la hora doce del ensayo, esto para obtener una mejor visión del comportamiento de aislamiento de los protoplastos.

Donde los mejores resultados se obtuvieron con macerozima 0,3% y celulasa 1,5% en la hora 10 con  $9 \times 10^5$  protoplastos por mL de solución de 0,8 gr de hoja.

Este tratamiento le brindó a los protoplastos mayor estabilidad logrando así una gran cantidad de protoplastos viables. Cabe recalcar que en todos los tratamientos a partir de las dos horas de incubación se obtuvieron protoplastos que pueden servir para ensayos posteriores en investigaciones que le competan a Melina.

Como se observa en la figura 16B mientras aumenta la concentración enzimática la viabilidad de los protoplastos tiende a disminuir. Según Rivera & Perea (2004) la eficiencia de la concentración enzimática va a depender en un 70% de la juventud del material inicial, es decir que para las hojas de un tiempo de 5 a 7 semanas las enzimas podrán actuar más rápido y mejor gracias a la falta de lignificación por ende contribuyen en una mejor penetración enzimática, usándose de esta forma hojas de una edad de 2 semanas.

Se observa que conforme aumenta la concentración enzimática, también aumenta el número de protoplastos. Según Krautwig & Lorz (1995) en su revisión de protoplastos a partir de cereales, se conoce que en callos muy friables, de color amarillento, la cantidad de enzima utilizada es indispensable para obtener una mayor o menor cantidad de protoplastos viables, a su vez en su estudios en cebada se encontró que una concentración de celulasa - macerozima 2% es suficiente para obtener una cantidad de protoplastos de  $3.8 \times 10^4$  por cada mL de solución en un tiempo de cinco horas de incubación a 25°C.

En plantas monocotiledonares el aumento de concentración de la celulasa incrementa la cantidad de protoplastos viables; y su cantidad depende del tipo de explante y su edad (Duquenne et al ., 2007). Kiong & colaboradores (2010) demuestra que utilizar una concentración enzimática de 2% celulasa-macerozima en 0.2gr callo friable es suficiente

para la obtención de  $1.7 \times 10^4$  protoplastos por mL de solución; con un porcentaje de viabilidad del 87%.

En el estudio realizado por Duquenne & colaboradores (2007) en una monocotiledónea, demuestra que el aumento específicamente de macerozima logra el rompimiento de las lamelas medias en callos, obteniendo así protoplastos aislados en tiempos reducidos; dando como mejor resultado en cuanto a disgregación celular concentraciones entre 0.2% y 0.4% con las que se observó una disminución en el tiempo del aislamiento celular y posterior aislamiento de protoplastos; esta es una de las posibles razones por las que se logró la recuperación de protoplastos libres en la mayoría de los tratamientos establecidos, adicional a las elevadas concentraciones enzimáticas.

Los protoplastos de maracuyá que proceden de hojas y cotiledones jóvenes, presentaron cloroplastos grandes con distribución uniforme en el citoplasma; mientras que el empleo de tejido foliar mayor de siete semanas y cotiledones senescentes, produjo menor cantidad de protoplastos, con cloroplastos que se condensaron en algunos sitios del citoplasma y con viabilidad menor al 70%. Los mayores rendimientos correspondieron a  $6,48 \times 10^5$  y  $4,60 \times 10^6$  protoplastos viables por 500 mg de tejido, obtenidos respectivamente con la combinación enzimática de Celulasa R-10 al 1% y Pectoliasa Y-23 al 0,05% a partir de hojas y la solución enzimática Celulasa al 2% y Macerozima al 0,4% para cotiledones (Rivera & Jadan, 2010).

En este trabajo se utilizó como estabilizador osmótico manitol al 13% en la fase de aislamiento, esta concentración fue muy eficiente para disminuir el choque osmótico generado por la digestión de la pared celular al igual que en lo realizado por Rivera & Perea (2004). En la maracuyá, Dornelas & Vieira (1993), evaluaron la utilización de concentraciones de manitol al 9 y 13%, observando que el manitol al 9% generó dificultades como la explosión de un gran número de protoplastos, mientras que al 13% mantiene las condiciones del nivel osmótico apropiadas sin afectar la viabilidad de los protoplastos.

Aunque se puede lograr mayor producción de protoplastos usando altas concentraciones

enzimáticas, en muchos casos la viabilidad se ve afectada ya que se puede producir lisis tan pronto son liberados (Botero-Giraldo et al., 2011). En un trabajo realizado en tomate, aunque inicialmente con 4 h de incubación y con baja concentración de enzimas no se logró aislamiento de protoplastos, la viabilidad de las células se mantuvo alta, no obstante con el mismo tiempo de incubación y mayor concentración enzimática tampoco se logró el aislamiento, sin embargo si presentó alto porcentaje de daño celular (Botero-Giraldo et al., 2011).

Al realizar el proceso para el aislamiento de los protoplastos se generan compuestos que pueden afectar la viabilidad, por la producción de compuestos que inhiben la digestión de la pared y subsecuentemente la liberación de protoplastos a partir del explante, como lo reporta Rao & Prakash (1995). Rethmeier & colaboradores (1991), relacionaron además la baja viabilidad y frecuencia de regeneración a partir de protoplastos con los altos niveles de etileno inducidos por las enzimas durante el aislamiento. De otro lado, Kennedy & De Filippis (2004) identificaron entre algunas estrategias para disminuir el efecto degradativo deletéreo durante el aislamiento, un control estricto del pH, evaluar el número de enzimas y la adición de antioxidantes e inhibidores de proteasas. Este último aspecto fue evaluado por Santos et al. (2010), quienes encontraron acumulación de proteínas extracelulares en el medio de cultivo debido a cambios estructurales o modificaciones bioquímicas a nivel celular que podrían estar relacionada con la lisis celular. Teniendo en cuenta que el daño celular incrementó con el tiempo de incubación, este es otro factor crítico a considerar, como lo informan Ishikawa & colaboradores (2010), Ling & colaboradores (2010), Horváth (2009), Pongchawee & colaboradores (2006) y Davey & colaboradores (2005).

Los resultados obtenidos en varios trabajos nos demuestra la importancia que tiene una adecuada combinación y concentración de enzimas en el aislamiento de protoplastos a partir de tejidos vegetales.

Encontrar una combinación adecuada ha sido determinante, bien por ser capaz de digerir los variados materiales específicos de la pared celular, bien porque las concentraciones

de las diferentes enzimas guarden un equilibrio que las haga funcionales, o bien por tener suficiente actividad sin llegar a tener un efecto tóxico. Sin embargo, junto a la combinación y concentración de las enzimas concurren otros aspectos que también condicionan el resultado final como el tiempo de incubación.

**8.3.4** Tiempo de incubación: es importante mencionar que en este estudio el conteo de protoplastos se realizó con los protoplastos promedios totales y viables; en el estudio realizado por Deep & colaboradores (2006) en *Brassica napus* se realizaron pruebas en cuanto al tiempo de incubación que concuerda con los resultados obtenidos, donde los mejores tiempos de incubación son de 10 horas y 12 horas en comparación con tiempos de 16 a 18 horas en las cuales existió menor cantidad de protoplastos viables.

En el estudio que se desarrolló en trigo por Arcos (2010) se realizó una prueba de Tukey para analizar el tiempo de digestión enzimática, donde las horas ocho, nueve y diez, presentan mayor cantidad de protoplastos viables con relación a la cantidad de células; esto guarda relación con los resultados presentes en este trabajo de investigación, ya que han sido los tiempos donde se encuentra la mayor cantidad de protoplastos viables y donde se observa mayor disgregación celular en Melina.

En el estudio realizado en *Eurycoma longifolia* por Kiong & colaboradores (2010) se evaluaron tiempos de incubación desde dos a seis horas en los que se demostró que en tiempos de dos a cuatro horas existe un incremento del 40% en la cantidad de protoplastos viables; el tiempo en el que se encontró mayor número de protoplastos con una concentración de celulasa-macerozima 1.5% con una cantidad de 0.2g de callo fue en la hora cuatro con  $5.58 \pm 1.5 \times 10^5$  protoplastos por mL de solución.

En la investigación realizada por Jadán & colaboradores (2004) en *Citrus sinensis* se demuestra que la acción que realizan las enzimas en horas iniciales de incubación empieza con la digestión de láminas medias alcanzando así una disgregación temprana para una posterior degradación de pared celular. También menciona que existen especies en las que es necesario aumentar la concentración enzimática para lograr obtener disgregaciones celulares completas, aun tratándose de callos, ya que debido a

la distribución celular en este, las enzimas podrían actuar únicamente en la parte superficial y continuar con la lamela media; por lo que la concentración enzimática en algunos casos son requeridas superiores a 1.5% celulasa-macerozima; y en este caso la recuperación de protoplastos aislados se encontraría en tiempos entre cuatro y seis horas de incubación; lo que coincide con el presente estudio en que se usa efectivamente la celulasa al 1,5% pero la macerozima fue al 0,5% a diferencia de lo sugerido pero esto se puede ver equilibrado en los tiempos de ambas investigaciones.

Periodos de exposición a la solución enzimática, superiores a 18 horas fueron nocivos, se observa aumento en liberación de protoplastos, pero hay disminución en la viabilidad, tal como se evidencia en la hora 10 para el tratamiento tres.

**8.3.5 Viabilidad:** Wakita & colaboradores (1992) menciona en su estudio que las concentraciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de callos deben estar entre 0.25% y 4% en cuanto a cocteles enzimáticos; en caso de usar mayores concentraciones es probable que no exista recuperación de protoplastos al someterlos a un daño excesivo y rompimiento prematuro de membranas.

En el trabajo realizado por Arcos (2010) se puede observar claramente que las curvas de concentraciones 2 y 3% celulasa-macerozima, presentan mayor tiempo de estabilidad, es decir que los protoplastos aislados se mantienen viables durante más horas con respecto a la concentraciones de 4% celulasa-macerozima. Wakita & colaboradores (1992) menciona además, que las mejores concentraciones enzimáticas para separar protoplastos de callos se encuentran entre 1 y 3% para celulasa, helicasas, pectinasas; con la finalidad de brindarle mayor estabilidad a los protoplastos aislados; es decir que su tiempo de sobrevivencia será mayor al utilizar reguladores osmóticos como manitol, sorbitol y sacarosa en concentraciones intermedias.

**8.3.6 Numero de protoplastos y disgregación celular:** en el trabajo realizado en trigo (Arcos, 2010) con el análisis de la prueba de Tukey se llegó a seis grupos para la

digestión enzimática de los cuales la disgregación completa se realizó en las horas de digestión nueve y diez, que coincide con la mayor cantidad de protoplastos viables.

En el estudio realizado por Beranek & colaboradores (2007) con *Brassica carinata* en oscuridad a una temperatura de 25°C con un cóctel enzimático de celulasa 1% y macerozima 0.5%; aunque no menciona el momento en el que inicia la disgregación completa se conoce que tuvo una disgregación total a las 16 horas de incubación. En el estudio de Nobre & colaboradores (1996) al utilizar el mismo cóctel enzimático presentado en este estudio la disgregación celular comenzó a las 3 horas después de la incubación; en nuestro estudio como se observa en la figura 15 el inicio de la disgregación fue a la hora 4 de la incubación a 27°C. Se debe recordar que los tiempos de acción enzimática son dependientes de la concentración de las enzimas usadas.

**8.3.7 Protoplastos:** los protoplastos obtenidos por lo general reflejan diferencias notables de acuerdo al tejido del cual fueron obtenidos; en el caso de los protoplastos del mesófilo o muy cercanos al mismo, se presentan en general tamaños entre 10 a 15µm, muy uniformes, totalmente esféricos (Arcos, 2010) estos resultados también coinciden con los protoplastos obtenidos por Kanai & Edwards (1973) en maíz, estudio en el que en promedio los protoplastos obtenidos de hoja, cercanos al mesófilo presentaron tamaños promedio de 13,7µm. En el estudio realizado por Sethi & Maeda (1983), los protoplastos obtenidos de la superficie de la hoja medían entre 10 y 100 µm mientras que aquellos encontrados en el mesófilo estaban entre 10 y 25 µm. En el trabajo realizado por Arcos (2010) explican que según la superficie de la hoja, las células que forman la epidermis superior se encuentran muy compactadas ya que su función es la protección; al someterse al estrés osmótico además de la digestión enzimática, estos tienden a ensancharse, más aún que aquellas células que se encuentran en el mesófilo, específicamente en el parénquima esponjoso que posee mayor espacio intercelular, y son células más pequeñas en comparación con las más superficiales, además que poseen menor cantidad de cloroplastos.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró obtener el primer reporte para aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea*, a partir de explantes foliares de plantas micropropagadas. Las concentraciones óptimas para el aislamiento de protoplastos viables fueron Celulasa R10 al 1,5% y Macerozima R10 al 0,5%, a las 10 horas liberando  $9 \times 10^5$  protoplastos por mL y un tamaño aproximado de  $10 \mu\text{m}$ .

El explante con mayor potencial morfogénico fue el nudo cotiledonar, siendo el único explante en generar brotes múltiples (4,25 brotes por explante en promedio) por medio de organogénesis directa e indirecta.



Los tratamientos BAP 2,2 uM y AIA 0,7 uM y BAP 4,4 uM en medio MS con glucosa al 3% fueron óptimos para la regeneración *in vitro* de melina, obteniéndose brotes múltiples en tiempos muy cortos (5 a 14 días), lo cual hace viable el uso de este eficiente protocolo de regeneración *in vitro* en futuros desarrollos de transformación genética para melina.

El tratamiento de auxinas óptimo para enraizamiento *in vitro* de brotes de melina fue AIB a 14,7 uM en concordancia con reportes previos, complementando la eficiencia del protocolo de regeneración *in vitro* logrado en este estudio.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda usar los callos generados por epicótilo e hipocótilos para a partir de estos continuar los procesos de regeneración pero con concentraciones de reguladores de crecimiento diferentes.

A su vez se recomienda que se usen alternativas diferentes a los reguladores de crecimiento usados, tales como los brasinosteroides, poliaminas o extractos de algunas plantas con estas cualidades.

El uso de concentraciones iguales de celulasa y macerozima para evaluar si con eso se logra disminuir el tiempo de aislamiento y mejorar las condiciones de viabilidad.

El uso de mesófilo y callos para determinar que tejido genera protoplastos en tiempos

más cortos sin perder su viabilidad, y quizás concentraciones menores de enzimas para aislamiento.

## REFERENCIAS

Acosta, C.C. (2012). La micropropagación en especies forestales. Ciencia actual- Vol 1. Numero 2 Julio/Diciembre 2011. ISSN 2248-468x.

Adobkar, I.M., Saad & Ahmed, M. Elshahed. (2012). Plant tissue culture media (Chapter 2). Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (ed) In: Recent advances in plant in vitro culture. ISBN 978-953-51-0787-3.

Aguilar, M., Melgarejo, L.M. & Romero, M. (2012). Fitohormonas. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.

- Ahuja, M.R. (1983). Protoplast Research in Woody plants. Federal research center for forestry and forest products. Institute of forest genetics and forest tree breeding.
- Allen, J.F., Alexciev, K. & Kansson, G.H. (1995). Regulation by Redox Signalling. *Current Biology* 5:869-872.
- Álvarez, M.J., Beltrán, D.P. y Mesa, N.L. (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* Roxb. *Revista Tumbaga* 2011/6/107-124.
- Alves, C., Quecini, V. & Viera, M. (1999). Plant transformation: Advances and Perspectives. *Scientia Agricola* 56 (1): pp.1-8.
- Andreu, P. & Marin, J.A. (2005). *In vitro* culture establishment and multiplication of the Prunus rootstock Adesoto 101 (*P. insitita*) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106: 258-267.
- Andreu, P., Arbeloa, A., Terrén, N. y Marín, J.A. (2009). Aislamiento y cultivo de protoplastos del patrón ciruelo 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick). Estación Experimental de Aula Dei (CSIC). Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza.
- Arcos, A.E. (2010). Obtencion y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas.trabajo de grado, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí.
- Auderisk, T. & Auderisk, G.(1997). *Biology, life on earth*. - New Caroline: Pearson- 569 p.
- Ayala, D.I. (2007). Regeneración de plantas de tabaquillo *Nicotiana glauca* a partir de protoplastos (trabajo de grado). Universidad San Francisco de Quito.

- Baghel, R.S., Tiwari, S. & Tripathi, M.K.(2008).Comparison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectona grandis* Linn. F).Journal of Agricultural Technology 2008, V.4(2): 125-136.
- Bangerth, F. & Schroder, M. (1994). Strong synergistic effects of gibberellins with the synthetic cytokinin N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea on parthenocarpic fruit set and some other fruit characteristics of apples. Plant Growth Regulation, [S.l.], v. 15, p. 293-302, 1994.
- Bartel, B., Leclere, S., Magidin, M. & Zolman, B.K. (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. Journal of Plant Growth Regulation 20: 198–216.
- Behera. P.R., Nayak. P., Thirunavoukkarasu. M. & Sahoo S.B. (2008). Plant regeneration of *Gmelina arborea* Roxb. From cotyledonary node explants. Indian J. Plant Physiol. 13: 3:258-265.
- Benavides, A. (1998). Modificación en los ambientes espectrales de crecimiento y en efecto sobre el comportamiento fisiológico y productividad de *Lactuca sativa* y *Spinacia oleracea*.Universidad Autónoma de Nueva León.
- Beranek, M., Bechyne, M. & Klima, M.(2007). Protoplast isolation and fusion between *Brassica carinata* Braun. and *Brassica rapa* L. AGRICULTURA TROPICA ET SUBTROPICA. VOL. 40 (1) 2007.
- Bifulco, M., Malfitano, A.M., Proto,M.C., Antonietta., Caruso, M.G. & Laezza, C. 2008. Biological and pharmacological roles of N6-Isopentenynadenosine: An emerging anticancerdrug. Anti cancer agents in medicinal chemistry (Formerly current medicinal chemistry anti cancer agents) Volume 8, Number 2, february 2008, pp. 200-204(5).

- Botero, C., Restrepo, C. y Urrea, A.I. (2011). Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo *in vitro* y aislamiento de protoplastos. *Actualidades Biológicas*, 33(94), 35-49, 2011. Retrieved December 05, 2014, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842011000100003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842011000100003&lng=en&tlng=es).
- Caffall, K.H., Mohnen, D.(2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res.* 2009 Sep 28;344(14):1879-900. doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021. Epub 2009 Jun 2
- Campbell N.A & Reece, J.B. (2005). *Biología*. Capítulo 39. Respuestas de las plantas a las señales internas y externas. Pag 788-812. ISBN 978-84-7903-998-1.
- Cardoza, V. (2005). Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter 5. Book *Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications*. (2005) ed. Stewart, C.N.
- Castañeda-Castro, O., Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I., Pastelín-Solano, M.C., Martínez-Ocampo, Y., González-Arnau, M.T. & Guevara-Valencia, M. (2009). Estado nutricional y crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar en respuesta a reguladores de crecimiento. *Terra Latinoamericana*, 27(3), 177-185. Recuperado en 27 de marzo de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792009000300002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792009000300002&lng=es&tlng=es).
- Castro, D., Díaz, J. y Murillo, M. (1999). Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal *in vitro* de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*), Melina (*Gmelina arborea*) y Roble (*Tabebuia rosea*). Universidad Católica de Oriente, Rionegro, p16-51.

- Chawla, H. (2002). Introduction to Plant Biotechnology. {Electronic version} India: Science Publisher. Extraído el 25 de mayo, 2010, de: <http://books.google.com.ec/books?id=RgQLISN8zT8C&pg=PA87&dq=protoplasts+isolation&cd=1#v=onepage&q=protoplasts%20isolation&f=false>.
- Chothani, D.L & Patel, N.M. (2012). Preliminary phytochemical screening, pharmacognostic and physicochemical evaluation of leaf of *Gmelina arborea*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012) S1333-S1337.
- Cocking, E. & Pojnar, E. (1969). An electron microscope study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. Genetics of virology: 4: 305-312.
- Coenen, G.J., Bakx, R.P., Verhoef, H.A., Schols & Voragen, A.G.J.(2007). Identification of the connecting linkage between homo or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I., Carbohydrate polymers 70: 224-235.
- Cosgrove, D.J.(2005).Growth of the plant cell wall.Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Nov;6(11):850-61.
- Cossio, L. (2013). Reguladores de crecimiento. Guía de estudio Facena-UNNE (Universidad Nacional del Nordeste), Argentina.
- Cuadrado, M. (1985). Influencia del tamaño del endocarpo de *Gmelina arborea* Roxb. en el crecimiento inicial fase de vivero en Pavones, Turrialba, Costa Rica. Centro agronómico tropical de investigación de enseñanza (CATIE).
- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. & Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast technology: Current status. Review. Acta Physiologiae Plantarum, 27 (1): 117-129.
- Davies, P.J. (1995). Plant hormones. Segunda edición. Klumer academic publishers. London. 833.

- Davies, P.J. (2013). Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology. Cornell University, Ithaca, New York, U.S.A. ISBN 978-0-7923-2985-5. DOI 10.1007/978-94-011-0473-9.
- Deep, N., Vyvadilova, M., Klima, M. & Bechyne, M. (2006). A simple procedure for mesophyll protoplasts culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. Genet. Plant breed 42 (3): 103-110.
- Deglène, L., Lesignès, P., Alibert, G. & Sarrafi, A. (1997). Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture February 1997, Volume 48, Issue 2, pp 127–130. DOI: 10.1023/A:1005803415142.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M.S., Jacquard, A., Nigel J. Kilby, N.J. & Murray, A.H.J. (2003). Altered Cell Cycle Distribution, Hyperplasia, and Inhibited Differentiation in *Arabidopsis* Caused by the D-Type Cyclin CYCD3. The Plant Cell January 2003 vol. 15 no. 1 79-92. Advance Publication December 19, 2002, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.004838>.
- Dhakulkar, S., Bhargava, S., Ganapathi, T.R. & Bapat, V.A. Bapat. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. Using *Agrobacterium rhizogenes* and production of verbascoside in hairy roots. Plant Science 169:5:812-818
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P. y Ríos, R. (2004). Transformación genética. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Ed). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA, Buenos Aires, p109-123.
- Divakaran, M., Pillai, G.S., Nirmal-Babu, K. & Peter, K.V. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. Current Science, 94 (1): 115-120.

- Dorion, N., Wies, N., Burteaux, A. & Bigot, C. (1999). Protoplast and leaf explants culture of *Lycopersicon cheesmanii* and salt tolerance of protoplast-derived calli. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 9-16.
- Dornelas, M.C. & Vieria, M.L.C. (1993). Plant Regeneration from Protoplast Cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, Degener *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata*, Mast. *Plant Cell Reports* 13: 103-106.
- Duquenne, B., Eeckaut, T., Werbrouk, S. & Huylenbroek, J. (2007). Effect of enzyme concentration on protoplasts isolation and protoplasts culture of *Statiphyllum*. *Plant cell, Tissue organ cult.* 91 (2): 165-173.
- Dvorak, W.S. (2004). World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges. *New Forest* 28: 111-126.
- Enders, T. A. & Strader, L. C. (2015). Auxin Activity: Past, present, and Future. *American Journal of Botany*, 102(2), 180–196. <http://doi.org/10.3732/ajb.1400285>.
- Fernández I. (2002). Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.) (Tesis de doctorado). Universidad de Colima, México.
- Figueroa, R.F. (2015). Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación in vitro de semilla de moringa (*Moringa oleifera* Lam.).(Trabajo de grado). Universidad técnica de Machala. Ecuador.
- Flick, C.E., Evans, D.A. & Sharp, W.R. (1983). Organogenesis. En Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. & Yamada, Y. (eds). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing Nueva York. V, 1, p, 13-81.



- Flors, V. (2000). alteracion de rutas metabolicas y promocion de defensas endogenas en *Lycopersicon esculentum* Mill y *Capsicum annuum* L. inducidas por la aplicacion de nuevos reguladores de crecimiento. Tesis de doctorado. Escuela superior de tecnologia y ciencias experimentales, Universitat Jaume I. España.
- Galarraga, M.Y. (2003). Establecimiento de un protocolo de desinfección, inducción y multiplicación *in vitro* a partir de segmentos apicales de plantas juveniles de *Podocarpus oleifolius* (Trabajo de grado). Escuela Politécnica del Ejercito. Sangolquí.
- Gamboa, J. y Aldenour, A. (1999). Micropropagación de Melina (*Gmelina arborea* ROBX). Agronomía Costarricense 23:69-76.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A. & Vasil, I.K. (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* 12, 473–478.
- Gao, Y., Zhao, B., Ding, G. & Zhang, Q. (2001) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflorum*. J. Beijing Forestry Univ. 23: 32–43.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. & Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—Plant 32:272-289, October-December 1996\_9 1996 Society for In Vitro Biology.
- Gaspar, T.H., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Cre` Vecoeur, M., Penel, C.L., Greppin, H. & Dommes, J.(2003).CHANGING CONCEPTS IN PLANT HORMONE ACTION.*In Vitro Cell. Dev. Biol.*—Plant 39:85–106, March–April 2003.DOI: 10.1079/IVP2002393.
- Gibeaut, D.M., Pauly, M.,Bacic, A., & Fincher, G.(2005).Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. *Planta* 221:729-738.

- Gonzaga, L. & Moreno, V. (2005). Análisis por citometría de flujo de callos embriogénicos de Aliso Andino (*Alnus acuminata* H.B.K). Scientia et technica Año XI No 28 octubre de 2005 pp: 205-209. UTP. ISSN 0122-1701.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C. & Meyerowitz, E.M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. En proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America 106 (38), pp. 16529-16534.
- Grebe, M., Jian, Xu. & Scheres, B. (2001). Cell axuality and polarity in plants — adding pieces to the puzzle. Current Opinion in Plant Biology Volume 4, Issue 6, 1 December 2001, Pages 520–526. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00210-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00210-7)
- Guo, J., Morrell-Falvey, J.L., Labbe, J.L., Muchero, W. & Kalluri, U.C. (2012). Highly Efficient Isolation of *Populus* Mesophyll Protoplasts and Its Application in Transient Expression Assays. PLOS ONE 7(9): e44908. doi:10.1371/journal.pone.0044908.
- Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54, 1-7.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. y Rodríguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal in vitro. e-Gnosis 1: 1-19.
- Harris, P.J. & Stone, B.A. (2008). Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In biomass Recalcitrance, M. Himmel, ed., Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., pp 61-93.

- Himstedt, J.P. & Jacobsen, H.J. (2001). Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Chrysanthemum* (*Dendranthema X grandiflorum*). Acta Hort. (ISHS) 560: 421–424.
- Horváth, E. (2009). Protoplast isolation from *Solanum lycopersicum* L. leaf tissue and their response to shortterm NaCl treatment. Acta Biologica Szegediensis, 53 (2): 83-86.
- Hussain, A., Ahmed Qarshi, I., Nazir, H. & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. <http://dx.doi.org/10.5772/50568>.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A. Darvill, A. & Albersheim, P. (1999). The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently crosslinked dimer. J. Biol. Chem., 274, 13098-13104.
- Ishikawa, F.H., Barcelos, Q de L., Souza, E.A. & Dias, E.S. (2010). Factors affecting the production and regeneration of protoplasts from *Colletotrichum lindemuthianum*. Ciência Agrotécnica (Lavras), 34 (1): 74-79.
- Jadan, M., Guevara, E. y Jiménez, V.M. (2004). Efecto de concentraciones enzimáticas y tiempos de digestión en el aislamiento de protoplastos a partir de callos y cultivos en suspensión de dos cultivares de naranja dulce (*Citrus sinensis* OSB). Rev. Agr. Trop. 34:41-5.
- Jain, S. M. (1997). Creation of variability by mutation and tissue culture in improving plants; Acta Hort. (in press). DOI 10.17660/ActaHortic.1997.447.6.
- Jang, J.C. & Sheen, J. (1994). Sugar Sensing in Higher Plants. Plant Cell 6:1665-1679.
- Jenik, P.D. & Barton, M.K. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. Development 132: 3577-3585.

- Jimenez, V.M.(2001) .Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* [online]. Vol.13, n.2, pp.196-223. ISSN 0103-3131. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000200008>.
- Johnson, A. A. T. & Veilleux, R. E. (2000) Somatic Hybridization and Applications in Plant Breeding, in Plant Breeding Reviews, Volume 20 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470650189.ch6.
- Jordan, M. & Cassareto, J. (2006). Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento. Fisiología Vegetal (Squeo, F.A & Cardemil,L. eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kanai, R. & Edwards, G. (1973). Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Plant Physiol.* (51): 1133-1137.
- Kannan, V.R. & Jasrai, Y.T. (1996). Micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant cell Tiss and Org Cult*, 46: 269-271.
- Kaul, V. Miller, M.R. Hutchison, J.F. & Richards, D. (1990). Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (sin. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 21: 21–30.
- Kennedy, B.F. & De Filippis, L.F. (2004). Tissue degradation and enzymatic activity observed during protoplast isolation in two ornamental *Grevillea* species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40 (1): 119-125.
- Kieber, J.J. & Schaller, E.(2014). Cytokinins. *Arabidopsis Book*. 2014; 12: e0168. Published online 2014 Jan 2. DOI: 10.1199/tab.0168.

- Kijkar, S. (2012). *Gmelina arborea* Roxb. Asociación de Naciones del Sudeste Asiático (ASEAN) Centro de Semillas Forestales, Tailandia.
- Kiong, A., Ting, G., Siang, C. & Hussein, S. (2010). Optimization of protoplasts isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. Journal of medicine plants research. Vol. 4 (17): 1778-1785.
- Kok, R. (2012). A revision of the genus *Gmelina* (Lamiaceae). KEW BULLETIN VOL. 67: 293 Y 329 (2012).
- Krautwig, B. & Lorz, H. (1995). Cereal protoplasts. Plant Science 111: 1-10.
- Kulawiec, M., Tagashira, N., Plader, W., Bartoszewski, M., Kuc, D., Snieszko, R. & Malepszy, S. (2003). Chromosome number variation in somatic hybrids between transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) and *Solanum lycopersicoides*. Journal of Applied Genetics, 44 (4): 431-447.
- Kusnetsov, V.V., Oelmüller, M., Sarwat, S.A., Porfirova, G.N., Cherepneva, R.G., Herrmann O.N & Kulaeva. (1994). Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons, without notable effect on steady-state mRNA levels. Planta 194, 318-327.
- Langford, P.J. & Wainright, H. (1988). Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of *in vitro* grown rose shoots. Acta Horticulturae 227:305-310.
- Lauridsen, E.B. (1986). *Gmelina arborea*, Linn. Seed Leaflet no. 6. Danida Forest Seed Centre, Humlebæk, Denmark.
- Lauridsen, E.B. & Kjaer E.D. (2002). Provenance research in *Gmelina arborea* Linn., Roxb. A summary of results from three decades of research and a discussion of how to use them. *Published in International Forestry Review* 4(1), 2002.

- Leegood, R. & Walker, K. (1979). Isolation of protoplasts and chloroplasts from flag leaves of *Triticum aestivum*. *Plant Physiol* (63): 1212-1214.
- Lefert, P.S., Becker-Andre, M., Schulz, W., Hahlbrock, K. & Dang, J.L. (1989). Functional Architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from Parsley. *The plant cell*. Vol 1, 707-714, July 1989. American Society of Plant Physiologists.
- Lin, Y.C., Li, W., Chen, H., Li, Q., Sun, Y.H., Shi.... Chiang, V.L. (2014). A simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation. 2194 | VOL.9 NO.9 | 2014 | nature protocols. doi:10.1038/nprot.2014.147.
- Lindsey, K. y Jones, M.G.K. (1992). Biología celular de la ingeniería genética. En: *Biotecnología vegetal agrícola*, Capítulo 6. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza. pp.105-142.
- Ling, A.P.K., Phua, G.A.T., Tee, C.S. & Hussein, S. (2010). Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (17): 1778-1785.
- Linsmaier, E.M. & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 18:100-127.
- Litz, R.E. & Jarret, R.L. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogenesis somática y organogenesis. In Roca W.M., Mroginski, L.A. (eds). *cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, pp 143-172 (Publicación CIAT no 151).
- Macdonald, H. (1997). Auxin perception and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100: 423-430.

- Madke, S.S., Cherian, K.J. & Badere, R.S. (2012). A modified Murashige and Skoog medio for efficient multiples shoot induction in *G. arborea* Roxb. Journal of forestry. Research. DOI 10.1007/s 11676-014-0449.
- Marín, A., Albarrán, J.G., Fuenmayor, F. y Perdomo, F.(2009).Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración in vitro de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).Revista UDO Agrícola 9 (3): 556-562. 2009.
- Mariño, Y.A. y Rodríguez, M.A. (2010). El punto de marchitez permanente (PMP) en melina (*Gmelina arborea* L. Roxb) para la Costa Caribe colombiana ¿una característica para la selección de clones?. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2010) 11(2), 116 -121.
- Marum, C.M. & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plants cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany, Vol. 62, No. 11, pp. 3713–3725, 2011 doi:10.1093/jxb/err155 Advance Access publication 26 May, 2011.
- Mathur, J. & Koncz, C. (2005). Callus and culture regeneration. Methods in molecular biology, Vol. 82: Arabidiopsis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Melcher, G. & Labib, G. (1974). Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. Molecular and General Genetics MGG 31, XII, 4: 277-294.
- Melchiorre, M., Victorio, G.R., Racca, R. & Lascano, R.(2009).Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. Plant growth regulation. January 2009, 57:57. DOI: 10.1007/s10725-008-9322-3.
- Meneses, A. (2001). El sílice, la luz, la concentración de los reguladores del crecimiento y del agente gelificante en los procesos de embriogénesis somática de arroz (*Oryza*

sativa l.) var. cr-5272.(Trabajo de grado).Centro de investigación en biología celular y molecular de la universidad de Costa rica.Costa rica.

Minocha, S.C. (1987). Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. Cell and tissue culture in forestry. Volume 24-26 of the series Forestry Sciences. Pp: 50-66. In: General Principles and biotechnology. Ed Bonga, J.M & Durzan, D.J. DOI: 10.1007/9798-94-017-0994-1\_4.

Minocha, S.C. & Jain, S.M.(2000). Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. In molecular Biology of Woody plants. Vol 1. pp. 315-339. ISBN 978-90-481-5338-1.DOI 10.1007/978-94-017-2311-4\_13.

Miyazaki, S. & Tashiro, Y. (1978). Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium*. IV. Explant sources for stem segment culture. Agr. Bull. Saga. Univ. 44: 67–78.

Mockaitis, K. & Estelle, M.(2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. Annu Rev Cell Dev Biol 24: 55–80. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123214

Mohnen, D.(2008).Pectin structure and biosynthesis. Curr Opin Plant Biol. 2008 Jun;11(3):266-77. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006. Epub 2008 May 15.

Moya, R. (2004). *Gmelina arborea* en Costa Rica. BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES, 2004, N° 279 (1).

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Murillo, O. (2004). Calidad y valoración de plantaciones forestales. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, p7-9.



- Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Tuskan, G.A., Hellsten, U., Hayes, R.D., Grimwood, J., Jenkins, J., .... Sansaloni, C.P. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510, 356–362. doi:10.1038/nature13308.
- Naik, D., Vartak, S. & Bhargava, S. (2003). Provenance- and subculture-dependent variation during micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73: 189–195.
- Nakamura, K. (2006). Micropropagation of *Shorea roxburghii* and *Gmelina arborea* by Shoot-Apex Culture. *Plantation Technology in Tropical Forest Science* -pp 137-150. DOI 10.1007/4-431-28054-5\_13.
- Nakamura, S.K. & Ide, Y. (1999). Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by in vitro culture. *J. For. Res.* 4:47-51.
- Nobre, J., Davey, M. & Lazzeri, P. (1996). Barley scutellum protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. *Physiologia plantarum* 98: 868-874.
- Nordstrom, A., P. Tarkowski, D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Astot, K. Dolezal y G. Sandberg. 2004. Auxin regulation of cytokinin nbiosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8039-8044.
- Obel, N., Erben, V., Schawrtz, T., Kuehnel, S., Fodor, A., & Pauly, M. (2009). Microanalysis of plant cell wall polysaccharides. *Mol. Plant* 2:922-932.
- Obregón, C. (2005). *Gmelina arborea* versatilidad, renovación y productividad sostenible para el futuro. *Revista El Mueble y La Madera*, Edición especial.
- O'Neill, M.A. & York, W.S.(2003) The composition and structure of primary cell walls. Rose JKC, editor. , , *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishers, Oxford, pp 1–54

- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. & Simons, A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).
- Osborne, D.J. & McManus, M.T. (2005). Hormones, Signals and target cells in plant development. ISBN 0-521-33076-9.
- Osorio, J.A., Bustamante, E.E., Macareno, M.M., Hernandez, E.J. y Beltran, J.D. (2010). Aislamiento enzimático de protoplastos a partir de mesófilo de *Dioscorea alata* cultivar "Pico de Botella". TEMAS AGRARIOS - Vol. 15:(1) Enero - Junio 2010 (58 - 70).
- Owen, H.R., Wengerd, D., & Miller, A.R. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method" (1991). Faculty Research & Creative Activity. Paper 143. [http://thekeep.eiu.edu/bio\\_fac/143](http://thekeep.eiu.edu/bio_fac/143).
- Pérez, J.N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. pp 390.
- Pérez, R.M. & Gómez, A. (2012). *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions.
- Pierik, L.M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pierik, R.L.M (1997). *In vitro* culture of higher plants. Kluwer academic publishers, University of Wageningen. ISBN 0-7923-4527-4.

- Pongchawee, K., Na-Nakorn, U., Lamseejan, S., Poompuang, S. & Phansiri, S. (2006). Factors affecting the protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. International Journal of Botany, 2 (2): 193-200.
- Puite, K. (1992). Progress in plant protoplast research. Physiologia plantarum (85): 403-410.
- Punitha, D., Thandavamoortly, A., Arumugasamy, K., Suresh, N.S., Danya, U. & Udhayasankar, R.M. (2012). Anti-hyperlipidemic effect of ethanolic leaf extract of *Gmelina arborea* in streptozotocin induced male Wistar albino rats. International Journal of Life science of Pharma Research, Vol 2/Issue 3/Jul-Sept 2012. ISSN 2250-0480.
- Quiroz-Castañeda, R.E. & Folch-Mallol, J.L. (2011). Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. Biotecnología Aplicada 2011; Vol.28, No.4. PP 205-215.
- Ramírez, C., Guerrero, E., Santamaría, L. y Hodson, E. (1994). Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. Memorias III Congreso de Especies Forestales, Bogotá, Universidad Javeriana, p547-559.
- Rao, K.S. & Prakash, A.H. (1995). A simple method for the isolation of plant protoplasts. J. Biosci., Vol. 20, Number 5, December 1995, pp 645-655. © Printed in India.
- Rayle, D.L. & Cleland R.E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol. 1992 Aug;99(4):1271-4.
- Rethmeier, N.O.M., Jansen, C.E., Snel, E.A.M., Nijkamp, H.J.J. & Hille, J. 1991. Improvement of regeneration of *Lycopersicon pennellii* protoplasts by decreasing ethylene production. Plant Cell Reports, 9: 539-543.

- Riofrío, L.A., Arias, A.S., Arahana V.S. y Torres, M.L.(2012). Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, USFQ.
- Rivera, R. y Perea, M. (2004). Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá. *Acta biológica colombiana*. Vol 9, No.2.
- Rizkalla, A.A., Badr-Elden, A.M. & Nower, A.A. (2007). Protoplast isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (10): 1186-1194.
- Roca. W.M. y Mroginski. L.A. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. ISBN 95B-9183-15-8.
- Rodríguez, F., Aguilar, D., Roque, R., Montoya, A., Gamboa. O. y Arguedas, M. (2004a). Manual para productores de melina *gmelina arborea* en costa rica.SIREFOR.
- Rodríguez, R. y Dallos, M. (2004b). Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 9 No. 2, 2004 35.
- Rohit. K., Patel. V., Chakraborty. M & Kamath, J. (2012). Phytochemical and pharmacological profile of *Gmelina arborea* an overview. *International research journal of pharmacy*. ISSN 2230-8407.
- Rojas, A., Moreno, L., Melgarejo, L.M. & Rodríguez M. (2012). Physiological response of *Gmelina* (*Gmelina arborea* Roxb.) to hydric conditions of the colombian Caribbean. *Agronomía Colombiana*, vol. 30, núm. 1, enero-abril, 2012, pp. 52-58.
- Rosero, C., Argout, X., Ruíz, M. & Teran, W. (2011). A drought stress transcriptome profiling as the first genomic resource for white teak - Gamhar - (*Gmelina*

*arborea* Roxb) and related species. Rosero et al. BMC Proceedings 2011, 5(Suppl 7):P178 <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/S7/P178>.

Russell, J.A. & McCown, B.H. (1986). Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science*, 46 (1986)133 - 142 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

Saftner, R.A., & Wyse, R. E. (1984). Effect of plant hormones on sugar uptake by sugar beet root tissue discs. *Plant Physiol.* 74:95 1-955.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. Annual Review of Plant Biology. Vol. 57:431-449 (Volume publication date 2 June 2006.DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231

Salisbury, F.B. & Ross, C.W. (1992). Plant Physiology. Wadsworth Publishing, Inc. USA

Santalla, M.J., Power, J.B.& Davey, M.R. (1998). Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102: 195-202

Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A. & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5, 301 - 307 (2009). Published online: 17 April 2009 | doi:10.1038/nchembio.165.

Santos, A.L.W., Silveira, V., Steiner, N., Maraschin, M. & Guerra, M.P. (2010). Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (3): 497-504.

Schenck, R.U. & Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204.

- Schum, A., Hofmann, K., Ghalib, N. & Tawflk, A. (2001). Factors affecting protoplast isolation and plant regeneration in *Rosa* spp. *Gartenbauwissenschaft*, 66 (3): 115-122.
- Segura, J. (2000a). Introducción al desarrollo capítulo 18. Concepto de hormona vegetal. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Pp 351-376.
- Segura, J. (2000b). Citoquininas, capítulo 21 en *Fundamentos de fisiología vegetal* Ed. Azcon-Bieto, J. & Talon, M. ISBN 84-486-0258-7. McGraw-hill.
- Serger, H. & Schmidt, W. (1986). Diversity of Photoreceptors. In: R.E. Kendrick and G.H.M. Kronenberg (eds.). *Photomorphogenesis in Plants*. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. P 137-158.
- Sethi, M. & Maeda, E. (1983). Studies on Wheat Protoplasts - A Rapid and Large scale Isolation Method and Cell Wall Regeneration in cultures. *Japan journal. Crop Sci.* 52(2): 158-167.
- Skoog, F. & Miller, C. (1965). Cytokinins. Vol. 148, Issue 3669, pp. 532-533. DOI: 10.1126/science.148.3669.532-a.
- Skoog, F. & Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. *In vitro Symp. Soc. Exp. Biol.*, v.11, p. 118-131, 1957.
- Skopec, C.E., Himmel, M.E., Matthews, J.F., & Brady, J.W. (2003). Energetics for displacing a single chain from the surface of microcrystalline cellulose into the active site of *Acidothermus cellulolyticus* Cel5A. *Protein Eng.* 16:1005-1015.
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. USA 3rd edition. ISBN 978-0-12-415920-4.

- Sterky, F., Bhalerao, R.R., Unneberg, P., Segerman, B., Nilsson, P., Brunner, A.M; Charbonnel-Campaa, L., .... Jansson, S. (2004). A Populus EST resource for plant functional genomics. PNAS, current issue, Vol. 101 n° 38. DOI: 10.1073/pnas.0401641101.
- Steward, F., Mapes, M., & Mears, K. (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2439728>.
- Steward, F.C. & Krikorian, A.D. (1971). Plants Chemicals and Growth. Academic press. New York.
- Suaréz, I.E; Jarma, A.J. & Avila M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol dc). TEMAS AGRARIOS - Vol. 11:(2), Julio - Diciembre 2006 (52 - 62).
- Sukartiningsih, Nakamura, K. & Ide, Y.J.(1999).Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by *in vitro* culture. Journal of Forest Research, February 1999, Volume 4, Issue 1, pp 47–51. DOI:10.1007/BF02760324
- Szabados, L. (1991). Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia): Publicación CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 240-270.
- Szabados, L., Narváez, J. y Roca, W.M. (1987). Técnicas para el aislamiento y cultivo de protoplastos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Unidad de Investigación en Biotecnología, Cali, CO. 46 p. (Documento de trabajo no. 23).

- Szczerbakowa, A., Borkowska, M. & Wielgat, B. (2000). Plant regeneration from the protoplasts of *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22 (1): 3-10.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Vol. 2. Edición Universitata Jaume. España. ISBN 978-84-8021-600-5.
- Takebe, I. & Nagata, T. (1973). Culture of isolated Tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301-8. 1970. DOI 10.1007/BF00392116.
- Teixeira, S.J.A. (2003). Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21: 715-766.
- Theologis, A. (1986). Rapid gene regulation by auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.
- Thorpe, T.A. (2014). History of Plant Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Town, M.H., Thummala, C. & Ghanta, R.G. (2008). Micropropagation of *Sterculiaurens Roxb.*, an endangered tree species from intact seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 7: 095–101.
- Ulloa, M.A. y Jadan, M. (2003). Aislamiento, Purificación y Fusión de Protoplastos de Babaco (*V. heilbornii*) y Jigacho (*V. stipulata*). *EIDOS*.
- Valdez, M. y Gatica Arias, A.M. (2009). Efecto de BAP y AIA en la regeneración de brotes a partir de explantes cotiledonares de genotipos de melón costarricense. *Agronomía Costarricense (Costa Rica)*. (2009). v. 33(1) p. 125-131.



- Valverde-Cerdas, L., Alvarado, L. & Hine, A. New Forests (2004). Micropropagation of clones from controlled crosses of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New Forests* September 2004, Volume 28, Issue 2, pp 187–194. doi:10.1023/B:NEFO.0000040945.75019.38
- Van Staden, J., Zazimalova, E. & George, E.F. (2008). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edn. Springer, Dordrecht, pp 205–226
- Vasil, I. & Thorpe, T. (1998). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer academic publisher: Países Bajos. ISBN 978-90-481-4327-6.
- Velazco, E.C. (2010). Efecto de aplicación con la fitohormona x-cyte y cuatro distanciamientos de siembra sobre rendimiento y calidad del cultivo de sandía (*Citrullus lanatus* Thunb) en los palos departamento de Tacna. (Trabajo de grado). Universidad nacional Jorge Basadre Grohman-Tacna.Peru.
- Vlainic, E. 1999. Hormonas de crecimiento. Trabajo semestral.
- Wakita, Y., Yokota, S. & Yoshizawa, N. (1992). Isolation and culture of protoplasts from Kunugi callus culture. *Plant tissue culture letters* 9 (2): 74- 80.
- Whetten, R., Sun, Y.H., Zhang, Y. & Sederoff, R. (2001). Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Molecular Biology*, September 2001, Volume 47, issue 1, p.p 275-291. DOI 10.1023/A:1010652003395.
- White, P.R. (1934) .Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9, 585–600.

- Wojtaszek, P., Volkmann, D. & Baluška, F.(2004).Polarity and cell walls.*In: Polarity in Plants, K Lindsey (ed), Blackwell Publishing , 72-121 (2004)*
- Wong, M.M., Cannon, C.H. & Wickneswari, R. (2011). Identification of lignin genes and regulatory sequences involved in secondary cell wall formation in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* via de novo transcriptome sequencing. *BMC Genomics*. 2011, 12: 342-DOI: 10.1186/1471-2164-12-342.
- Yang, J.C., Tsay, J.Y., Chung, J.D., & Chen, Z.Z. (1993). *In vitro* clonal propagation and cell suspension culture of *Gmelina arborea* R., *Bull. Taiwan For. Res. Inst.* 80 ): 1-9.
- Yepes, A. (2006). Revigorización y establecimiento *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb.V. Mediante cultivo de tejidos vegetales. *Colombia Forestal*, 2006-12-00 vol:9 nro:19 pág:70-87.
- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. <http://dx.doi.org/10.5772/51097>.
- Zhang, H., Peng, G. & Feishi, L.(2011). *Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of Cucumis melo L.* *African Journal of Biotechnology*. Journal Home > Vol 10, No 35 (2011) >
- Zhao, Y. (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current opinion in plant biology* 2008, 11: 16-22. DOI 10.1016/j.pbi.2007.10.2008.
- Zolman, B.K., Martinez, N., Millius, A., Adham, A.R. & Bartel, B. (2008). Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* 180 (1): pp. 237–251.

Zykwinska, A. Thibault, J.F & Ralet, M.C (2007). Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J Exp Bot* (2007) 58 (7): 1795-1802. DOI:<https://doi.org/10.1093/jxb/erm037>.

# ANEXOS

**Anexo A.** Prueba de normalidad para nudo cotiledonar respecto a diferentes reguladores de crecimiento.

**Pruebas de normalidad<sup>a</sup>**

	tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Nºbrotes	BAP2,2	,298	4	.	,849	4	,224
	BAP 2,2- AIA0,7	,214	4	.	,963	4	,798
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,441	4	.	,630	4	,001
	BAP 3,3	,303	4	.	,791	4	,086
	BAP 3,3 - AIA 0,7	,303	4	.	,791	4	,086
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,353	4	.	,744	4	,034
	BAP 4,4	,288	4	.	,887	4	,369
	BAP 4,4 - AIA 0,7	,441	4	.	,630	4	,001
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,260	4	.	,827	4	,161

**Anexo B.** Homogeneidad de varianzas para nudo cotiledonar respecto a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Nbrotes

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,366	9	30	,037

**Anexo C.** Prueba de Tukey para nudo cotiledonares.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: N°brotes

HSD Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	BAP2,2	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 2,2 - AIA0,7	-4,2500	1,47479	,155	-9,2808	,7808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 3,3	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-3,2500	1,47479	,476	-8,2808	1,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-3,7500	1,47479	,287	-8,7808	1,2808
	BAP 4,4	-4,2500	1,47479	,155	-9,2808	,7808
	BAP 4,4 - AIA 0,7	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
BAP2,2	control	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 2,2 - AIA0,7	-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 3,3	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-2,0000	1,47479	,931	-7,0308	3,0308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 4,4	-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808

BAP 2,2- AIA0,7	control	4,2500	1,47479	,155	- ,7808	9,2808
	BAP2,2	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	1,0000	1,47479	,999	-4,0308	6,0308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
BAP 2,2 - AIA 1,4	control	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP2,2	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 3,3	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	- ,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 4,4	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 4,4 - AIA 0,7	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 4,4 - AIA 1,4	- ,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
BAP 3,3	control	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP2,2	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	- ,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 4,4	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808



	BAP 4,4 - AIA 0,7	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-5,000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
BAP 3,3 - AIA 0,7	control	3,2500	1,47479	,476	-1,7808	8,2808
	BAP2,2	2,0000	1,47479	,931	-3,0308	7,0308
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,0000	1,47479	,999	-6,0308	4,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 3,3	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-5,000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 4,4	-1,0000	1,47479	,999	-6,0308	4,0308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	1,5000	1,47479	,989	-3,5308	6,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,2500	1,47479	1,000	-4,7808	5,2808
BAP 3,3 - AIA 1,4	control	3,7500	1,47479	,287	-1,2808	8,7808
	BAP2,2	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 2,2- AIA0,7	-5,000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 3,3	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4	-5,000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,0000	1,47479	,931	-3,0308	7,0308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
BAP 4,4	control	4,2500	1,47479	,155	-,7808	9,2808
	BAP2,2	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP 2,2- AIA0,7	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808

	BAP 3,3 - AIA 0,7	1,0000	1,47479	,999	-4,0308	6,0308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
BAP 4,4 - AIA 0,7	control	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP2,2	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 2,2- AIA0,7	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-1,5000	1,47479	,989	-6,5308	3,5308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-2,0000	1,47479	,931	-7,0308	3,0308
	BAP 4,4	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
BAP 4,4 - AIA 1,4	control	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP2,2	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 3,3	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-,2500	1,47479	1,000	-5,2808	4,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 4,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 4,4 - AIA 0,7	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 4,350.

**Anexo D.** Prueba de normalidad de Shapiro Wilks para protoplastos viables y totales.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
totales	72	100,0%	0	,0%	72	100,0%
viables	72	100,0%	0	,0%	72	100,0%
Descriptivos						
					Estadístico	Error típ.
totales	Media				100543,40	16713,652
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior		67217,33	
			Límite superior		133869,48	
	Media recortada al 5%				85062,89	
	Mediana				24250,00	
	Varianza				2,011E10	
	Desv. típ.				141820,042	
	Mínimo				0	
	Máximo				554375	
	Rango				554375	
	Amplitud intercuartil				169281	
	Asimetría				1,488	,283
	Curtosis				1,287	,559
viables	Media				70746,53	11635,340
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior		47546,32	
			Límite superior		93946,74	
	Media recortada al 5%				58748,07	
	Mediana				15000,00	
	Varianza				9,747E9	
	Desv. típ.				98729,136	
	Mínimo				0	

	Máximo	445250	
	Rango	445250	
	Amplitud intercuartil	129875	
	Asimetría	1,675	,283
	Curtosis	2,710	,559


**Anexo E.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos totales y viables con respecto al tiempo.

<b>Rangos</b>			
	Hora	N	Rango promedio
totales	2 horas	12	18,67
	4 horas	12	30,79
	6 horas	12	37,63
	8 horas	12	41,17
	10 horas	12	45,38
	12 horas	12	45,38
	Total	72	
<b>Rangos</b>			
	Hora	N	Rango promedio
viables	2 horas	12	18,71
	4 horas	12	30,92
	6 horas	12	37,92
	8 horas	12	41,75
	10 horas	12	45,67
	12 horas	12	44,04
	Total	72	

**Anexo F.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos totales y viables con respecto a las concentraciones enzimáticas.

<b>Rangos</b>			
	Tratamiento	N	Rango promedio
totales	Control	18	12,00
	tratamiento 1	18	37,31
	tratamiento 2	18	45,92
	tratamiento 3	18	50,78
	Total	72	

<b>Rangos</b>			
	Tratamiento	N	Rango promedio
viables	Control	18	12,00
	tratamiento 1	18	36,92
	tratamiento 2	18	45,53
	tratamiento 3	18	51,56
	Total	72	

 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

_____ LIESEL GAMARRA REINOSO	con C.C N°	_____ 1018456004
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

**Autorizar**

☒

**No Autorizar**

☐

**Motivo:**

\_\_\_\_\_


La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **Regeneración *in vitro* vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* a partir de plantas *in vitro*.**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**BIOLOGA**

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Artículo publicado en revista:

---

- Capítulo publicado en libro:

---

- Conferencia a la que se presentó:

---



